



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE CELULAR NO ENDOMÉTRIO DA CADELA**

SÍLVIA ALEXANDRA DA FONSECA CRUZ

CONSTITUIÇÃO DO JURI

**Presidente:**

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

**Vogais:**

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutor Mário António Pereira da Silva

Soares de Pinho

Dra. Patrícia Carla Pimentel Cabral

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

CO-ORIENTADOR

Dra. Patrícia Carla Pimentel Cabral

2011

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE CELULAR NO ENDOMÉTRIO DA CADELA**

SÍLVIA ALEXANDRA DA FONSECA CRUZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JURI

**Presidente:**

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

**Vogais:**

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutor Mário António Pereira da Silva

Soares de Pinho

Dra. Patrícia Carla Pimentel Cabral

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

CO-ORIENTADOR

Dra. Patrícia Carla Pimentel Cabral

2011

LISBOA

À minha avó Madalena.



## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar quero agradecer aos Professores Doutores Robalo Silva, Luís Costa e Luísa Mateus, que no meu 4ºano me apresentaram o mundo da Reprodução e Obstetrícia que desde aí me fascinou.

À minha orientadora, Professora Doutora Luísa Mateus, pelo seu infinito conhecimento, por toda a disponibilidade, por todo apoio prestado na elaboração e desenvolvimento deste trabalho, pelo acompanhamento cuidado, pelo seu incansável sentido crítico na revisão minuciosa desta dissertação, e acima de tudo por toda a dedicação e paciência com que me acompanhou 7 dias por semana.

À minha co-orientadora, Dra. Patrícia Cabral, não só pelo excelente acompanhamento ao longo de todo o estágio e por todos os conhecimentos transmitidos, mas também por todo o carinho e amizade que nos bons e maus momentos me reconfortaram e sem os quais estes meses tinham sido muito mais complicados. A sua postura única perante a prática clínica e o seu incrível amor pelos animais fez com que fosse (e ainda seja) um exemplo para mim, tanto profissional como pessoal.

A todos os Professores e Funcionários desta magnífica Faculdade que me acompanharam nesta caminhada de estudante, pelo fascínio com que me mostraram o mundo da Medicina Veterinária, agradeço-lhes toda a ajuda e conhecimentos que me facultaram que certamente me tornaram uma profissional capaz.

A todos os membros da secção de Reprodução e Obstetrícia, em especial à Doutora Maria Elisabete Silva, à Sofia Henriques e à Patrícia Diniz, pela imensa ajuda que me prestaram na elaboração deste trabalho, por todos os ensinamentos que me incutiram e sobretudo por tornarem a minha experiência na investigação motivante e até divertida. O meu sincero agradecimento pela disponibilidade e por toda a amizade.

Aos Veterinários, Enfermeiras, Auxiliares, e a todos os funcionários do Hospital Veterinário da Estefânia (HVE), pelo apoio e pela transmissão de conhecimentos que neste momento possuo, pela camaradagem e por todos os momentos de boa disposição.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), e às pessoas que o constituem, por me terem acolhido com carinho e amizade durante os meses de estágio e que contribuíram, de uma forma ou outra, para a execução prática deste trabalho.

À Liga Portuguesa dos Direitos do Animal (LPDA), a todo o corpo clínico em especial à Dra. Célia Antunes, Dra. Teresa Landeiro, Dr. Gonçalo Pereira e Dra Marta Passos, não só pela sua pronta disponibilidade e ajuda na colheita de material mas também pela constante boa disposição que os caracteriza.

Ao Canil Municipal de Sintra (CMS) e a todos os funcionários, especialmente à Dra. Alexandra Pereira, ao Alberto Garcia e ao voluntário Tiago Gonçalves, pela incansável disponibilidade e ajuda na colheita de material de estudo.

À Professora Conceição Peleteiro, responsável pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), por nos ter aberto amavelmente as portas do laboratório, permitindo o processamento do material biológico sem o qual o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

À D<sup>a</sup>. Maria do Rosário Luís e Sandra Carvalho, técnicas do Laboratório de Anatomia Patológica da FMV, pela sua disponível e solícita colaboração durante o desenvolvimento deste estudo, nomeadamente na preparação, fixação e coloração de cortes histológicos.

Aos meus Pais, por me tornarem a pessoa que hoje sou, por todo o apoio financeiro ao longo do meu percurso académico, pela ajuda prestada nos momentos mais complicados da minha vida e sobretudo por acreditarem em mim com amor e paciência incondicionais.

Ao Tiago, pela paciência sem fim, por me aturar mesmo quando nem eu me aturo, por saber sempre o que dizer nas alturas mais difíceis e pelo amor e carinho aos quais me habituou.

À minha família mais próxima e aos meus amigos, que, mesmo sem referir nomes, sabem o quanto são importantes para mim pela preciosa amizade, boa disposição e ajuda demonstrada ao longo destes anos.

À Xara, pela companhia que me fez nas centenas de horas ao computador rodeada de artigos, pelo seu apoio ilimitado, e por me fazer ver que os animais são umas criaturas incríveis.

A todos, o meu sincero OBRIGADA!

## RESUMO

### PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE CELULAR NO ENDOMÉTRIO DA CADELA

Durante o ciclo éstrico, o endométrio da cadela sofre alterações morfológicas e bioquímicas que estão associadas com a proliferação, a apoptose e a diferenciação celular. O conhecimento destes padrões é importante para o estudo dos mecanismos envolvidos nas alterações patológicas como a hiperplasia quística do endométrio que é comum em cadelas mais velhas. Apesar do mecanismo que leva a esta alteração ainda não ser claro, pensa-se que a estimulação estrogénica seguida por um longo período de dominância progestagénica possa estar envolvida.

O primeiro objectivo do presente estudo foi avaliar e caracterizar o padrão de proliferação e de apoptose celular no endométrio normal de cadela durante o ciclo éstrico. Observaram-se dois picos de proliferação, um no proestro em todos os grupos celulares e outro nos primeiros 10 dias de diestro apenas nas células epiteliais das glândulas basais. Em ambos os casos, a proliferação celular parece resultar do efeito directo do estrogénio ao nível do endométrio. O índice apoptótico mais elevado foi observado nas glândulas basais durante o período intermédio do diestro, após o período inicial de proliferação. Deste modo, a regressão do epitélio glandular basal está associada a mecanismos apoptóticos. Pelo contrário, a degenerescência do epitélio luminal observada no fim do diestro e início de anestro não parece estar associada a esses mesmos mecanismos.

As hormonas esteróides são factores importantes que influenciam a diferenciação glandular, a proliferação celular e a actividade secretora do endométrio. Deste modo, o segundo objectivo deste trabalho foi estabelecer *in vitro* um modelo tridimensional de endométrio canino que possibilite o estudo de factores de estimulação e de inibição de crescimento e diferenciação celular. Neste modelo, o estradiol levou a um aumento da proliferação celular, contrariamente ao observado após estimulação isolada com medroxiprogesterona ou em combinação com o estradiol.

**Palavras-chave:** Cadela; Endométrio; Proliferação; Apoptose; Cultura de células





## **ABSTRACT**

### **CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN THE CANINE ENDOMETRIUM**

During the estrous cycle, the canine endometrium undergoes manifest morphological and biochemical changes that are associated with proliferation, apoptosis and cell differentiation. The knowledge of these patterns is relevant for the understanding of the mechanisms involved in pathological conditions such as cystic endometrial hyperplasia, common in older bitches. Although the mechanism leading to this change is not yet clear, it is thought that estrogen stimulation followed by a long period of progesterone dominance may be involved. The first aim of this study was to evaluate and characterize the pattern of cell proliferation and apoptosis in normal canine endometrium during the oestrus cycle. There were two peaks of proliferation: one during proestrus in all cell groups and other at the first 10 days of diestrus only in epithelial cells of the basal glands. In both cases, cell proliferation appears to result from direct effect of estrogen in endometrium. The highest apoptotic index was observed in the basal glands during the intermediate period of diestrus after the initial period of proliferation. Thus, the regression of the basal glandular epithelium is associated with apoptotic mechanisms. In contrast, degeneration of luminal epithelium observed at the end of diestrus and early anestrus does not seem to be associated with these same mechanisms. Steroid hormones are important factors that influence glandular differentiation, cell proliferation and secretory activity of the endometrium. Thus the second aim of this study was to establish a three-dimensional in vitro system of canine endometrium suitable to the study of stimulation and inhibition factors of cell growth and differentiation. In this model, estradiol led to an increase in cell proliferation, contrary to that observed after stimulation with medroxyprogesterone alone or in combination with estradiol.

**Key words:** Bitch; Endometrium; Proliferation; Apoptosis; Cell culture.



## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos .....	vii
Resumo .....	ix
<i>Abstract</i> .....	xi
Índice geral .....	xiii
Índice de figuras .....	xv
Índice de tabelas.....	xvi
Índice de gráficos.....	xvi
Índice de abreviaturas.....	xvii
I – Relatório de Estágio.....	1
II – Introdução e Objectivos .....	3
III – Revisão Bibliográfica .....	5
1. Ciclo éstrico da cadela - Caracterização hormonal e fisiológica .....	5
1.1. Proestro .....	6
1.2. Estro .....	7
1.3. Diestro .....	9
1.4. Anestro .....	10
2. Alterações histológicas do útero ao longo do ciclo éstrico da cadela.....	12
3. Receptores de estrogénio e receptores de progesterona no endométrio da cadela ao longo do ciclo éstrico.....	14
4. Apoptose – Mecanismo da morte celular programada.....	16
4.1. Características morfológicas, bioquímicas e moleculares da apoptose .....	17
4.2. Vias de activação da apoptose.....	19
4.2.1. Via extrínseca.....	19
4.2.2. Via intrínseca.....	20
4.3. Caspases como iniciadoras e executoras da apoptose .....	22
4.4. Apoptose no endométrio da mulher.....	23
Capítulo I .....	25
Proliferação e apoptose celular no endométrio normal durante o ciclo éstrico da cadela.....	25
1. Introdução e Objectivos.....	25
2. Material e métodos.....	25
2.1. Animais .....	25
2.1.1. Colheita de Amostras .....	26
2.1.2. Caracterização das Amostras .....	26
2.2. Marcação por imunohistoquímica do Ki-67.....	28
2.3. TUNEL .....	29

2.4.	Análise quantitativa .....	30
2.5.	Análise estatística .....	30
3.	Resultados .....	31
3.1.	Progesterona.....	31
3.2.	Análise histológica do útero.....	32
3.3.	Avaliação do índice de proliferação celular .....	35
3.4.	Avaliação da apoptose .....	37
4.	Discussão dos resultados.....	44
5.	Conclusão .....	48
Capítulo II .....		49
Isolamento e cultura de células do endométrio canino num sistema tridimensional .....		49
1.	Introdução e Objectivos.....	49
2.	Material e métodos.....	49
2.1.	Animais .....	49
2.1.1.	Colheita das amostras .....	50
2.1.2.	Caracterização das amostras .....	50
2.2.	Isolamento e cultura de células .....	51
2.3.	Estimulação da cultura de células .....	53
2.4.	Imunohistoquímica .....	54
2.4.1.	Marcação por imunohistoquímica da vimentina e da citoqueratina .....	54
2.4.2.	Marcação por imunohistoquímica do Ki-67 .....	55
2.4.3.	Receptores de estrogénio e receptores de progesterona.....	56
3.	Resultados .....	57
3.1.	Isolamento e Cultura .....	57
3.2.	Marcação imunohistoquímica das citoqueratinas e da vimentina .....	59
3.3.	Proliferação celular e marcação dos receptores de estrogénio.....	60
4.	Discussão dos resultados.....	62
5.	Conclusão .....	65
Bibliografia .....		67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ciclo éstrico da cadela: duração das diferentes fases que o constituem. ....	5
<b>Figura 2</b> – Ilustração das alterações hormonais e da sequência de eventos relativamente à ovulação e fertilização. ....	8
<b>Figura 3</b> - Características morfológicas da apoptose e necrose. ....	18
<b>Figura 4</b> - Via extrínseca de activação da apoptose. ....	20
<b>Figura 5</b> - Via intrínseca de activação da apoptose. ....	21
<b>Figura 6</b> - Convergência das duas vias da apoptose na activação das caspases executoras. ....	23
<b>Figura 7</b> – Proestro - cortes histológicos de útero (coloração H&E). ....	32
<b>Figura 8</b> - Estro - cortes histológicos de útero (coloração H&E). ....	32
<b>Figura 9</b> – Início de diestro (0-10dias) - cortes histológicos de útero (coloração H&E). ....	33
<b>Figura 10</b> – Glândulas basais do endométrio durante o diestro - cortes histológicos de útero (coloração H&E). ....	33
<b>Figura 11</b> – Epitélio luminal do endométrio durante o diestro - cortes histológicos de útero (coloração H&E). ....	34
<b>Figura 12</b> - Anestro - cortes histológicos de útero (coloração H&E). ....	34
<b>Figura 13</b> – Cortes histológicos de útero de cadela em proestro – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL. ....	39
<b>Figura 14</b> - Cortes histológicos de útero de cadela em estro – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL. ....	40
<b>Figura 15</b> – Cortes histológicos de útero de cadela no início de diestro (0-10dias) – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL. ....	40
<b>Figura 16</b> – Cortes histológicos de útero de cadela no início de diestro (11-30 dias) – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL. ....	41
<b>Figura 17</b> – Cortes histológicos de útero de cadela no meio de diestro – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL. ....	41
<b>Figura 18</b> – Glândulas basais do endométrio - cortes histológicos de útero de cadela no meio de diestro (coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL). ....	42
<b>Figura 19</b> - Cortes histológicos de útero de cadela no fim de diestro – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL. ....	42
<b>Figura 20</b> – Cortes histológicos de útero de cadela em anestro – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL. ....	43
<b>Figura 21</b> – Algumas etapas do processo de isolamento e cultura de células. ....	53
<b>Figura 22</b> – Esquema ilustrativo dos poços utilizados para cada amostra com a respectiva estimulação hormonal realizada. ....	53
<b>Figura 23</b> – Organóides obtidos após 2h de digestão na solução de collagenase A (microscópio invertido, 80x). ....	57
<b>Figura 24</b> – Dois passos de filtração realizados para o isolamento das células epiteliais e das células do estroma do endométrio de cadela. ....	58
<b>Figura 25</b> – Aspecto dos organóides no matrigel aos 2 dias de cultura. ....	59
<b>Figura 26</b> – Marcação imunohistoquímica das citoqueratinas e da vimentina. ....	59
<b>Figura 27</b> - Caracterização imunohistoquímica (Ki-67 e RE) dos organóides em co-cultura (400x). ....	61

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Parâmetros usados na determinação da fase do ciclo éstrico de cada cadela....	27
<b>Tabela 2</b> – Classificação por índices de apoptose (Adaptado de Chu <i>et al</i> (2006)). .....	30
<b>Tabela 3</b> – Índices de proliferação dos diferentes tipos celulares no endométrio ao longo do ciclo éstrico da cadela (média e erro padrão).....	35
<b>Tabela 4</b> - Índices de apoptose dos diferentes tipos celulares no endométrio ao longo do ciclo éstrico da cadela (média e erro padrão).....	37
<b>Tabela 5</b> – Constituição dos meios utilizados na cultura de células. ....	52

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Concentrações séricas de progesterona das cadelas em estudo, conforme as várias fases do ciclo éstrico. ....	31
<b>Gráfico 2</b> – Índices de proliferação nos vários compartimentos celulares ao longo do ciclo éstrico. ....	36
<b>Gráfico 3</b> - Índices de apoptose nos vários compartimentos celulares ao longo do ciclo éstrico. ....	38

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

% - Percentagem  
µg – Microgramas  
µl – Microlitros  
µm - Micrómetros  
A – Anestro  
AIF - *Apoptosis-Inducing Factor*  
APAF-1 - *Apoptosis proteases activating factor - 1*  
ATP – *Adenosine Triphosphate*  
BSA – *Bovine serum albumin*  
CIISA – Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal  
CMS – Canil Municipal de Sintra  
DD – *Death Domain*  
DED – *Death Effector Domain*  
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's medium*  
DNA – *Desoxiribonucleic Nucleic Acid*  
DR – *Death Receptor*  
DR3 – *Death Receptor 3*  
DR4 – *Death Receptor 4*  
DR5 – *Death Receptor 5*  
DR6 – *Death Receptor 6*  
E - Estro  
E<sub>2</sub> – Estrogénio  
EGF – *Epidermal Growth Factor*  
EHS – *Engelbreth-Holm-Swarm*  
EUA – Estados Unidos da América  
FADD – *Fas-Associated Death Domain*  
FasL – Fas ligante  
FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia  
FD – Fim de diestro  
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária  
FMV – UTL – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa  
FSH – Hormona folículo-estimulante  
h – hora(s)  
H&E – Coloração Hematoxilina-Eosina  
HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*  
HEFMV – Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária  
HQE – Hiperplasia Quística do Endométrio  
HQE-P – Complexo Hiperplasia Quística – Piómetra  
HVE – Hospital Veterinário da Estefânia  
IAPs - *Inhibitor of Apoptosis Proteins*  
ID 0-10 – Início de diestro (0-10dias)  
ID 11-30 – Início de diestro (11-30dias)  
IGF1 – *Insulin Growth Factor 1*  
IgG – Imunoglobulina G  
KCl – Cloreto de potássio  
Kg – Quilogramas  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Hidrogenofosfato de potássio  
LH – Hormona luteinizante  
LPDA – Liga Portuguesa dos Direitos do Animal  
MD – Meio de diestro  
mg – Miligramas  
min – Minutos  
ml – Mililitros  
mm - milímetros



mM – milimolar  
 MP - Medroxiprogesterona  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – Fosfato de sódio  
 NaCl – Cloreto de sódio  
 ng – Nanogramas  
 °C – Graus centígrados  
 ON – *Overnight*  
 OVH – Ovariectomia  
 p – Significância  
 $\text{P}_4$  – Progesterona  
 PBS – *Phosphate Buffered Saline*  
 PE - Proestro  
 PE1 – Início do proestro  
 PE2 – Meio do proestro  
 PE3 – Fim do proestro  
 pH – potencial hidrogeniônico  
 PMNs – Polimorfonucleares neutrófilos  
 RE – Receptores de estrogênio  
 RP – Receptores de progesterona  
 rTNF – *Tumor Necrosis Factor Receptor*  
 rTNFI – *Tumor Necrosis Factor Receptor I*  
 SFB – Soro Fetal Bovino  
 SMAC/Diablo - *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP- Binding protein with a low isoelectric point*  
 TBS - *Tris Buffered Saline*  
 TGF- $\alpha$  – *Transforming Growth Factor- $\alpha$*   
 TNF- $\alpha$  – *Tumor Necrosis Factor –  $\alpha$*   
 TUNEL – *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*  
 UV – Ultravioleta

## **I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO**

Na recta final do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, é imperativa a realização de um período de estágio curricular. Este permite ao aluno colocar em prática, perante situações e casos reais, os conhecimentos adquiridos ao longo de cinco anos de aprendizagem. Cria-se desta forma uma ponte entre Faculdade e actividade profissional futura, o que se traduz pelo crescimento e evolução de Aluno a Médico Veterinário.

O estágio curricular foi realizado no Hospital Veterinário da Estefânia (HVE) em Lisboa, tendo como orientadora a Professora Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus (Sector Reprodução e Obstetrícia do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa) e como co-orientadora a Dra. Patrícia Carla Pimentel Cabral (Coordenadora Clínica do HVE). Teve início a 6 de Setembro de 2010 e terminou a 6 de Março 2011. Simultaneamente com a prática clínica fui desenvolvendo o trabalho laboratorial do meu projecto de mestrado no Laboratório de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) e ainda no Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal (CIISA), trabalho este que se estendeu por mais 6 meses após o término do estágio clínico.

Durante o período de estágio no HVE fiz rotação pelos serviços de Medicina, Internamento, Cirurgia, Imagiologia, Análises Clínicas e Urgência Nocturna. Para além destes serviços, uma vez por semana (normalmente à 4ª feira) o dia foi dedicado à colheita de úteros de cadelas submetidas a ovariectomia na Liga Portuguesa dos Direitos do Animal (LPDA) em Carcavelos e ainda ao seguimento de casos clínicos da área de Reprodução no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HEFMV).

No serviço de Medicina Interna e Internamento foi-me possível consolidar muitos dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso tais como, avaliação clínica, plano de diagnósticos diferenciais e terapêutica, fazer admissão de pacientes para internamento, bem como colocar em prática procedimentos médicos comuns (colheita de sangue; cateterização endovenosa e vesical; medição de pressão arterial pelo método oscilométrico e com Doppler; administração de medicação pelas várias vias; realização de pensos; abdominocentese e toracocentese entre outros).

No serviço de cirurgia realizei diversas tarefas desde a recepção e preparação do paciente, à indução anestésica e monitorização durante toda a cirurgia. Foi-me possível observar e ajudar em diversos tipos de cirurgias desde cirurgias de rotina (orquiectomias, ovariectomias, nodulectomias, mastectomias, destartarizações e extracções dentárias) a cirurgias de urgência e em pacientes críticos (piómetra rupturada, colecistectomia por mucocelo salivar; esplenectomia; torção gástrica, enterectomia, entre outras). Para além disso competia-me efectuar a monitorização clínica pós-cirúrgica desses mesmos pacientes.

No serviço de Imagiologia participei nos mais variados procedimentos envolvidos, quer na realização e interpretação radiográfica, como na realização de ecografias e ecocardiografias.

Na área de análises clínicas efectuei hemogramas, microhematócrito, análises bioquímicas de sangue, ionogramas, esfregaços sanguíneos, citologias, análises de sedimento urinário, testes rápidos, tipificação de grupo sanguíneo, entre outros.

Na urgência nocturna, assisti o veterinário de serviço durante a noite, tanto na recepção e estabilização de pacientes que recorriam ao serviço de urgência do hospital, como no acompanhamento dos animais internados em estado crítico durante todo o período nocturno.

Sendo o HVE um Hospital veterinário de referência e apresentar elevada casuística, contactei com um leque variado de casos – seu tratamento, evolução e desfecho -, em diferentes áreas e especialidades clínicas. Tal permitiu-me a aquisição de aptidões fundamentalmente práticas, com origem na crescente responsabilidade que me foi atribuída na realização das minhas actividades. Todos estes aspectos permitiram o desenvolvimento, de uma adequada preparação para a minha futura profissão, baseada não só em elevados padrões clínicos e científicos, mas também éticos e de profissionalismo.

Relativamente à área de Reprodução e Obstetrícia sempre que possível acompanhei a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Doutora Luísa Mateus nas suas consultas de especialidade. Assisti e pratiquei a inúmeras ecografias associadas a diagnósticos de gestação e a confirmações de afecções reprodutivas como por exemplo: em machos hiperplasia benigna prostática e tumores testiculares; em fêmeas piómetra e hiperplasia quística do endométrio. Assisti e auxiliei ainda à prática de recolha de sémen em cão, seguida da inseminação artificial da cadela com sémen fresco.

Ao terminar o período de estágio dediquei-me exclusivamente à investigação, continuando a recolher úteros na LPDA, no HVE, no HEFMV e ainda no Canil Municipal de Sintra (CMS).

No laboratório de Reprodução e com o auxílio da minha orientadora aprendi a identificar facilmente as fases do ciclo éstrico em cadelas, a analisar cortes histológicos de útero e ovários de cadela, a fazer doseamentos por quimioluminescência e ainda a fazer cultura de células. Trabalhei também no CIISA onde, com a colaboração da Doutora Maria Elisabete Silva e da Sofia Henriques (Estudante de Doutoramento), aprendi diversas técnicas de laboratório nomeadamente imunohistoquímica. Todos estes conhecimentos adquiridos em laboratório tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

## II – INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

O ciclo éstrico caracteriza-se por modificações cíclicas que ocorrem nas fêmeas após a puberdade e é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos (Benetti *et al.*, 2004). Quando comparado com o das outras espécies, o ciclo éstrico da cadela possui algumas características únicas: é consideravelmente mais longo; possui um período de anestro não sazonal de duração variável (Chandra & Adler, 2008); e ainda um diestro gestante e diestro não gestante com uma duração semelhante (Feldman & Nelson, 2004; Concannon *et al.*, 2009).

Durante o ciclo éstrico, o endométrio da cadela sofre alterações morfológicas e bioquímicas que estão associadas com a proliferação, a apoptose e a diferenciação celular. O conhecimento destes padrões é importante para o estudo dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da gestação e nas alterações patológicas como o complexo hiperplasia quística do endométrio – piómetra (HQE-P) que é comum em cadelas nulíparas (Van Cruchten & *et al.*, 2004).

A hiperplasia quística do endométrio (HQE) é uma causa frequente de infertilidade em cadelas mais velhas. A etiopatogenia da HQE ainda não está completamente esclarecida, sabendo-se porém que é uma alteração hormono-dependente e que pode predispor ao desenvolvimento de piómetra (Payan Carreira & Pires, 2005). Pensa-se que a contínua estimulação estrogénica seguida por um longo período de dominância progestagénica possa estar envolvida (Stadler *et al.*, 2009). Como tal, o estabelecimento de um modelo *in vitro* que permita o estudo do efeito das hormonas esteróides nas células endometriais é relevante para avançar no conhecimento desta afecção.

Este trabalho teve como objectivos:

1. Avaliar a proliferação e apoptose celular no endométrio normal durante o ciclo éstrico normal da cadela.
2. Estabelecer *in vitro* um modelo tridimensional de endométrio canino que possibilite o estudo de factores de estimulação e de inibição de crescimento e diferenciação celular.

Este trabalho faz parte do projecto “Contribuição para o estudo da fisiopatologia do complexo hiperplasia quística do endométrio - piómetra na cadela”, subsidiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) - PTDC/CVT/66587/2006 e pelo CIISA/FMV 74 - Hiperplasia do endométrio.

Parte do trabalho realizado foi submetida e aceite no V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias que irá decorrer entre os dias 13 e 15 Outubro de 2011, na Estação Zootécnica Nacional em Santarém, com os seguintes títulos:

*Poster:*

“Proliferação e apoptose celular no endométrio durante o ciclo éstrico da cadela”

**Henriques S., Cruz S., Silva E., Ferreira-Dias G., Lopes da Costa L., Mateus L.**

CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal

Comunicação oral:

“Isolamento e cultura de células do endométrio canino num sistema tridimensional”

**Cruz S., Diniz P., Silva E., Henriques S., Ferreira-Dias G., Lopes da Costa L., Mateus L.**

CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal

### III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

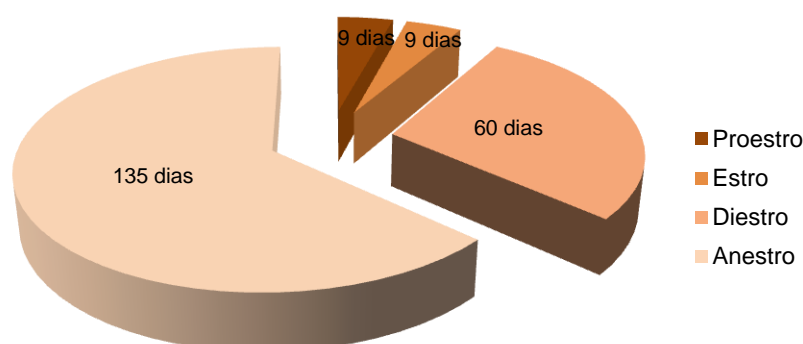
#### 1. CICLO ÉSTRICO DA CADELA - CARACTERIZAÇÃO HORMONAL E FISIOLÓGICA

O ciclo éstrico caracteriza-se por modificações cíclicas que ocorrem nas fêmeas após a puberdade e é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos (Benetti *et al.*, 2004).

Na cadela a puberdade é caracterizada pelo aparecimento de cio pela primeira vez. Nesta espécie, a raça tem um papel muito importante e, genericamente, a puberdade inicia-se vários meses após atingirem o peso e altura de adulto. As raças de pequeno porte normalmente têm o primeiro cio entre os 6 e os 10 meses de idade; já as raças de grande porte podem apresentá-lo antes do primeiro ano de idade ou apenas aos 18-24 meses (Feldman & Nelson, 2004).

A cadela é uma fêmea monoéstrica uma vez que apenas exibe um ciclo éstrico por cada época reprodutiva. O seu ciclo éstrico compreende quatro fases características e sucessivas: proestro, estro, diestro e anestro (Benetti *et al.*, 2004; Feldman & Nelson, 2004; Concannon, 2010) (Figura 1). Estas fases reflectem, respectivamente: fase folicular com domínio do estrogénio, início da fase lútea com aumento da concentração de progesterona e decréscimo da concentração de estrogénio, a restante fase lútea e uma fase de quiescência ovárica até ao início do próximo ciclo (Concannon, 2010). O intervalo entre ciclos éstricos varia de 5 a 11 meses (em média 7 meses), havendo uma grande variabilidade rácica e até mesmo individual (Feldman & Nelson, 2004).

**Figura 1** - Ciclo éstrico da cadela: duração das diferentes fases que o constituem.



**Legenda:** Os valores indicam a média da duração de cada uma das fases (Feldman & Nelson, 2004).

## 1.1. PROESTRO

O início do ciclo éstrico, o proestro, é geralmente marcado pelo aparecimento de sinais externos consequentes do aumento das concentrações de estrogénio, nomeadamente o edema da vulva e o corrimento vulvar sanguinolento (Feldman & Nelson, 2004).

Esta fase dura em média 9 dias (6-11 dias) (Feldman & Nelson, 2004; Concannon *et al.*, 2009) e é caracterizada pelo aumento progressivo: no tamanho (edema) e turgidez da vulva; no edema da mucosa vaginal; na proliferação e cornificação do epitélio vaginal; no número de células epiteliais na citologia vaginal; e secreção vaginal de feromonas (metil p-hidroxibenzoato) que atraem os machos (Concannon, 2010). Contudo, durante esta fase a fêmea não está receptiva ao macho, podendo mesmo ser agressiva quando o macho tenta acasalar (Feldman & Nelson, 2004; Concannon, 2010).

Durante o proestro, a mucosa vaginal apresenta grandes pregas redondas, edematosas e lisas devido à chamada de água provocada pelo estrogénio. Também devido ao aumento dos níveis de estrogénio, ocorre uma rápida multiplicação das células o que leva ao aumento do número de camadas de células do epitélio vaginal. Essa multiplicação faz com que as células luminais se afastem do suprimento sanguíneo, resultando na morte das mesmas. Tal facto torna o tecido muito menos sensível e frágil, o que adicionado ao desenvolvimento de precursores de queratina nessas células, previne traumatismos durante a cópula (Feldman & Nelson, 2004).

Um esfregaço vaginal de uma cadela em início de proestro apresenta-se com variável número de eritrócitos e numerosas células parabasais e intermédias. Podem ser encontrados neutrófilos, mas não abundantemente, e ainda bactérias. O fundo do esfregaço é aparentemente sujo, devido à presença de secreções cervicais e vaginais viscosas que coram facilmente. Com a acção contínua do estrogénio, ocorrem alterações visíveis na citologia vaginal, nomeadamente: desaparecimento dos neutrófilos (deixam de ser capazes de atravessar a espessa parede vaginal); as células parabasais e intermédias pequenas vão sendo substituídas por células intermédias grandes e por células superficiais. Os eritrócitos podem ou não estar presentes, e o fundo pode continuar sujo ou apresentar-se claro. No final do proestro, o esfregaço já não contém neutrófilos, a presença de células sanguíneas é variável, e o fundo é claro. Cerca de 70% das células são superficiais com núcleos picnóticos ou anucleadas (Feldman & Nelson, 2004; Concannon, 2010).

A mucosa uterina também passa por mudanças semelhantes, uma vez que o endométrio se prepara para a implantação através de um marcado aumento da espessura da parede uterina e da actividade glandular. Essas mudanças podem estar associadas inicialmente à presença do corrimento sanguíneo (Feldman & Nelson, 2004).

Nesta fase, os estrógenios são sintetizados e secretados pelos folículos ovários em desenvolvimento. No início do proestro, a concentração de estrogénio, que no anestro se

encontra entre 5-15 pg/mL, aumenta para 25 pg/mL atingindo concentrações de 60-70 pg/mL no final. O pico da concentração plasmática de estrogénio ocorre 24-48 horas antes do início do estro (Feldman & Nelson, 2004; Concannon *et al.*, 2009).

Os níveis de progesterona durante o proestro, excepto nas últimas 24-72 horas, são basais (< 0,5ng/mL). O final do proestro é caracterizado pela elevação dos níveis de progesterona (1ng/mL) e decréscimo dos níveis de estrogénio após o pico (60-70pg/mL). Até que ocorra ovulação e desenvolvimento do corpo lúteo, a progesterona resulta da luteinização progressiva da parede dos folículos (Benetti *et al.*, 2004; Feldman & Nelson, 2004). Esta luteinização da parede dos folículos é histologicamente visível até 6 dias antes do pico de LH (Concannon *et al.*, 2009).

Alguns picos de hormona luteinizante (LH) são visíveis no início do proestro, mas depois os níveis basais são mantidos até que ocorra o pico máximo. Esse pico de LH pode ocorrer no final do proestro em algumas cadelas ou no início do estro noutras cadelas, mas convencionalmente é associado à transição entre as duas fases (Feldman & Nelson, 2004).

## **1.2. ESTRO**

O estro inclui o período durante o qual a cadela está receptiva ao macho, cuja duração é normalmente de 5 a 9 dias (Feldman & Nelson, 2004; Concannon 2010). Semelhante ao proestro, a extensão desta fase pode variar entre cadelas normais, contudo, cada cadela é geralmente constante de ciclo para ciclo entre os 2 e 6 anos de idade (Feldman & Nelson, 2004).

A vulva torna-se macia e flácida. A secreção vaginal é muitas vezes cor-de-palha ou rosada e, com menor frequência, pode continuar evidentemente sanguínea (Feldman & Nelson, 2004).

A citologia vaginal mantém-se relativamente constante durante todo o estro, não havendo mudanças que sugiram o dia do pico de LH ou o dia da ovulação. As células superficiais queratinizadas representam mais de 80% do total das células vaginais, podendo mesmo atingir os 100%. Não se observam neutrófilos, os eritrócitos podem ou não estar presentes e o fundo do esfregaço encontra-se limpo (Feldman & Nelson, 2004; Concannon 2010).

Com o decréscimo da concentração de estrogénio, a mucosa vaginal fica enrugada (crenulada), alteração que é máxima entre a ovulação e a maturação dos oócitos. No final do estro, a mucosa volta a ficar flácida e cada vez mais lisa (Feldman & Nelson, 2004).

Durante todo este período, o útero continua a preparar-se para uma possível implantação. O sangramento da microvasculatura uterina está diminuído ou extinguido e o desenvolvimento glandular com aumento da vasculatura está quase completo. O útero pode tornar-se palpável num exame abdominal cauteloso (Feldman & Nelson, 2004).



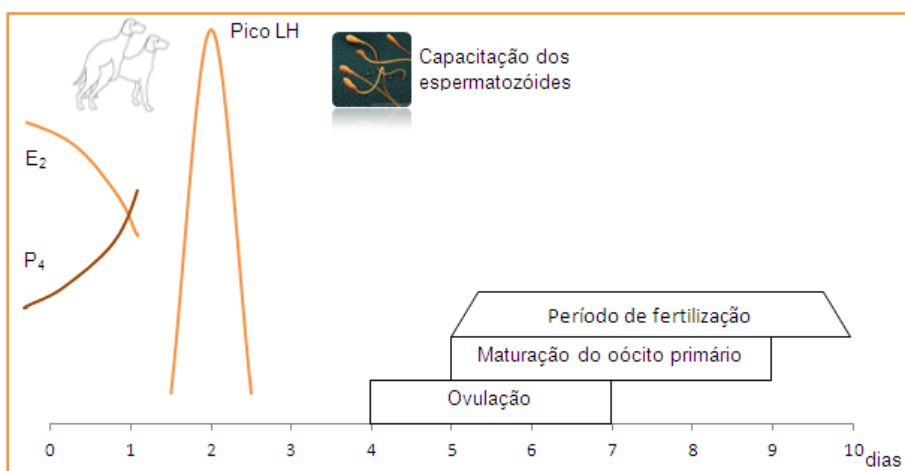
Simultaneamente com o declínio dos níveis de estrógeno, as células do folículo ovárico começam a sofrer luteinização e a secretar progesterona. A combinação do decréscimo do estrogênio com o aumento da progesterona nos últimos dias do proestro é responsável pela mudança do comportamento da cadela bem como pelo forte “feedback” positivo para o hipotálamo e a hipófise que resulta na secreção de FSH e, mais importante, LH no início do estro (Feldman & Nelson, 2004; Concannon *et al.*, 2009).

Aproximadamente 24-48 horas antes do pico de LH, a concentração de progesterona atinge 1 ng/mL, alcançando concentrações entre 2 e 4 ng/mL durante o pico de LH. No momento da ovulação (cerca de 2 dias após o pico de LH), a concentração encontra-se entre 4 e 10 ng/mL. É de salientar que toda esta progesterona é produzida antes do desenvolvimento do corpo lúteo (Feldman & Nelson, 2004).

A ovulação, espontânea na cadela, ocorre 24-72 horas depois do pico de LH. Raças pequenas ovulam poucos óvulos (2 a 10), quando comparado às raças grandes, que podem ovular 5 a 20. Após ruptura dos folículos, toda a estrutura que permanece no ovário reorganiza-se havendo luteinização com consequente desenvolvimento do corpo lúteo que é capaz de sustentar a síntese e secreção de progesterona por 2 meses ou mais (Feldman & Nelson, 2004; Concannon *et al.*, 2009).

A maior parte das cadelas exibe comportamento de cio aquando a diminuição da concentração de estrogênio simultânea com aumento da concentração progesterona (dia 1; Figura 2). O dia 2 corresponde ao pico de LH e o dia 3 ao final da maturação folicular com continua secreção de progesterona pelas células foliculares luteinizadas. Entre os dias 4 e 7 ocorre a ovulação e do dia 5 a 9 a maturação dos oócitos primários em oócitos secundários prontos a serem fecundados. Do dia 4 a 9 pode ocorrer fertilização e o dia 10 corresponde ao primeiro dia do diestro (Feldman & Nelson, 2004).

**Figura 2** – Ilustração das alterações hormonais e da sequência de eventos relativamente à ovulação e fertilização.



**Legenda:** E<sub>2</sub> – Estrogênio; P<sub>4</sub> – Progesterona; LH – Hormona luteinizante; O dia 0 corresponde ao início do estro e o dia 10 ao início de diestro (Adaptado de Feldman & Nelson, 2004).

### 1.3. DIESTRO

O diestro é definido como o período compreendido entre o fim do estro até que a progesterona produzida pelo corpo lúteo volte a valores basais (1ng/mL). A duração é em média de 56-58 dias nas cadelas gestantes e 60-80 dias nas não gestantes (Feldman & Nelson, 2004).

O diestro começa quando uma cadela previamente receptiva recusa abruptamente aceitar a monta de um macho, e pode também deixar de ser atractiva para os machos. A vulva retorna ao tamanho normal e deixa de estar flácida. Clinicamente não há nenhuma diferença entre uma cadela em anestro e uma em diestro não gestante (Feldman & Nelson, 2004).

A citologia vaginal de uma cadela que entra em diestro é bastante característica. Num período de 24-48 horas a percentagem de células superficiais decresce para aproximadamente 30%, sendo a maioria células intermédias ou parabasais. Estas células vão diminuindo de número ao longo do diestro. No final do diestro, o esfregaço vaginal assemelha-se com o do anestro: glóbulos brancos podem estar presentes em pequeno número; eritrócitos estão ausentes ou em pequeno número; e as células epiteliais tipicamente consistem em células parabasais e pequenas células intermédias (Feldman & Nelson, 2004).

Nesta fase o útero responde ao aumento da concentração de progesterona com hipertrofia das suas estruturas glandulares e da vasculatura. Estas são duas das mudanças endometriais observadas na preparação para a gestação. O tamanho máximo do útero é atingido 20-30 dias após o início do estro, o que coincide com a elevada concentração de progesterona (Feldman & Nelson, 2004).

Após a ovulação (estro), ocorre desenvolvimento do corpo lúteo que é responsável por manter a concentração plasmática de progesterona elevada, atingindo esta concentrações de 15-60 ng/mL 20-30 dias após a ovulação. Esta concentração mantém-se elevada durante 1 a 2 semanas e depois diminui progressivamente (Feldman & Nelson, 2004).

Todas as cadelas não gestantes saudáveis que tenham ovulado são pseudogestantes na medida que elas possuem um corpo lúteo funcional (Feldman & Nelson, 2004; Concannon 2010).

Enquanto que na cadela gestante a fase lútea termina abruptamente, na cadela pseudogestante declina lentamente durante 10 a 20 dias. Na cadela gestante as prostaglandinas parecem ser o factor luteolítico (Feldman & Nelson, 2004). Tanto nas cadelas gestantes como nas não gestantes, a regressão do corpo lúteo está relacionada com mecanismos apoptóticos (Aiudi *et al.*, 2006; Luz *et al.*, 2006; Concannon *et al.*, 2009).

A concentração de estrogénio no princípio do diestro está normalmente em níveis basais (Feldman & Nelson, 2004). Porém, outros estudos referem que durante o diestro as

concentrações de estrogénio se mantêm elevadas, principalmente durante os primeiros 10 dias de diestro (Onclin *et al.*, 2002; Polisca *et al.*, 2010).

Há evidências que durante a última ou duas últimas semanas de gestação a concentração de estrógeno apresenta um súbito aumento. Talvez esse discreto acréscimo na síntese e secreção de estrógeno ocorra de acordo com a queda na concentração de progesterona, como uma necessidade endócrina em estimular o relaxamento cervical e outros factores do parto. Porém essa pequena concentração de estrógeno não causa atracção aos machos nem outras alterações evidentes associadas com proestro (Benetti *et al.*, 2004; Feldman & Nelson, 2004).

#### **1.4. ANESTRO**

Anestro é a fase do ciclo éstrico durante a qual o útero sofre involução. Em cadelas gestantes, o anestro começa com o parto. Porém, o início desta fase não é prontamente discernível em cadelas não gestantes, nas quais não há uma transição clinicamente detectável. O útero durante o anestro sofre um processo de reparação, principalmente ao nível do endométrio, que geralmente se completa em 120 dias num ciclo não gestante e 140 dias num ciclo fértil (Feldman & Nelson, 2004).

Como as outras fases do ciclo, o anestro varia em duração, dependendo da raça, do estado hígido, da idade, do período do ano, do ambiente, entre outros factores. Numa cadela que inicie o proestro a cada 7 meses, o proestro dura 9 dias, o estro 7 a 9 dias, o diestro 58 dias, e o anestro 4,5 meses. Contudo, isso pode ser variável, porque é difícil saber quando o diestro acaba e o anestro começa numa cadela não gestante (Feldman & Nelson, 2004).

Em termos clínicos, não há nenhuma diferença evidente entre uma cadela no anestro e uma cadela castrada. A citologia vaginal desta fase é relativamente constante: são observadas células parabasais e pequenas células intermédias; neutrófilos podem ou não estar presentes; eritrócitos estão normalmente ausentes; bactérias podem ou não estar presentes e quando presentes geralmente representam a microflora normal (Feldman & Nelson, 2004). Nesta fase, enquanto que a progesterona se mantém basal, a concentração de estrógeno flutua significativamente. Parece haver um padrão das concentrações de estrogénio uma vez que são observados picos que se presume serem derivados de ondas de crescimento folicular estimuladas por pequenas elevações da FSH pituitária. Esses folículos sintetizam e secretam estrógeno, causando acréscimos mínimos na concentração de estrógeno circulante. Uma vez que esses folículos nunca ficam totalmente maduros, eles regredem depois de um curto período (Feldman & Nelson, 2004).

Aumentos esporádicos na secreção de LH ocorrem durante o anestro, o que resulta em dois breves, mas potentes episódios secretórios: um pico de LH precede imediatamente o início do proestro, e um precede ou coincide com o início do estro e subsequente ovulação. Os

pulsos repetidos mas de baixa concentração que ocorrem durante o anestro podem preparar um número significativo de folículos para o desenvolvimento e iniciar o processo de maturação assim como a ovulação (Feldman & Nelson, 2004; Concannon *et al.*, 2009).

Contrariamente ao observado com a LH, a concentração de FSH apresenta variações moderadas durante o anestro, diminui no início do proestro e aumenta no pico de LH durante a onda pré-ovulatória (Feldman & Nelson, 2004; Concannon *et al.*, 2009).

Não é conhecido o que causa o início do proestro e o começo do novo ciclo. Provavelmente resulta de interações complexas entre ambiente, saúde geral, estado ovárico e uterino, idade e outros factores (Feldman & Nelson, 2004).

## 2. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO ÚTERO AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO DA CADELA

Alguns dos sinais clínicos ou comportamentais característicos de cada fase do ciclo éstrico podem surgir abruptamente, como por exemplo o aparecimento do corrimento sanguíneo e a aceitação do macho. Contudo, as alterações histológicas dos tecidos, nomeadamente no endométrio, ocorrem gradualmente durante vários dias (Rehm *et al.*, 2007).

Em fêmeas pré-púberes, o endométrio apresenta-se imaturo com poucas glândulas presentes no estroma e o miométrio encontra-se ainda pouco desenvolvido (Rehm *et al.*, 2007). As características histológicas do útero de uma fêmea imatura assemelham-se às do útero de uma fêmea em anestro (Chandra & Adler, 2008).

Durante o proestro, o estroma do endométrio apresenta-se cada vez mais edematoso, conferindo ao lúmen a forma de cruz ou “X” em corte transversal do útero (Rehm *et al.*, 2007). As glândulas basais desenvolvem-se e o epitélio luminal do endométrio prolifera formando invaginações no estroma que originam as criptas (Rehm *et al.*, 2007; Chandra & Adler, 2008). Há um aumento da hiperemia capilar que está associada ao extravasamento das hemácias para o lúmen uterino, o que, em conjunto com as secreções das glândulas uterinas, contribui para o corrimento sanguinolento característico desta fase do ciclo éstrico (Rehm *et al.*, 2007). O miométrio mostra-se cada vez mais desenvolvido, com células musculares lisas de maior dimensão e mais eosinofílicas (Rehm *et al.*, 2007; Chandra & Adler, 2008).

No início do estro o endométrio ainda se apresenta edematoso. Contudo, após a ovulação, há redução desse edema, aumento do colagénio no estroma e as glândulas tanto basais como as das criptas tornam-se cada vez mais desenvolvidas. Paralelamente há uma contínua proliferação e hipertrofia das células musculares lisas do miométrio (Rehm *et al.*, 2007; Chandra & Adler, 2008).

No diestro, tanto o endométrio como o miométrio atingem a maior espessura e densidade celular de todo o ciclo éstrico. O estroma possui uma rede densa de colagénio e as glândulas basais têm uma aparência enrolada que é bastante distinta da morfologia das criptas. No início do diestro, as células epiteliais das criptas são altas e com núcleos fracamente basófilos; com o avançar desta fase, o citoplasma torna-se vacuolizado devido à acumulação lipídica. A partir da terceira semana de diestro inicia-se o processo de regressão uterina, cujas alterações são marcadas pela ampla apoptose do endométrio,

achatamento do epitélio glandular basal e perda de colagénio do estroma (Rehm *et al.*, 2007; Chandra & Adler, 2008).

No anestro, o endométrio e o miométrio estão atrofiados. A redução do citoplasma das células resulta numa alta densidade nuclear (Rehm *et al.*, 2007; Chandra & Adler, 2008).

### 3. RECEPTORES DE ESTROGÉNIO E RECEPTORES DE PROGESTERONA NO ENDOMÉTRIO DA CADELA AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO

Durante o ciclo éstrico, as alterações morfológicas e fisiológicas que ocorrem no útero da cadela devem-se à influência de hormonas esteróides através da sua ligação a receptores específicos localizados nas células alvo. Como tal, o efeito do estrogénio e da progesterona é mediado pelos seus receptores nos tecidos alvo. Do mesmo modo, a presença de receptores de estrogénio (RE) e de progesterona (RP) é regulada pelas hormonas esteróides (Oehler *et al.*, 2000).

No endométrio de cadela, a expressão nuclear de RE é maior durante o proestro tanto nas células epiteliais como nas células do estroma (De Cock *et al.*, 1997; Vermeirsch *et al.*, 1999). Este facto sugere uma influência positiva do estradiol, cuja concentração nesta altura está elevada, e implica uma elevada sensibilidade do tecido uterino ao efeito proliferativo do estradiol (Vermeirsch *et al.*, 1999).

Durante o estro verifica-se uma diminuição dos RE em todos os grupos celulares que coincide com o aumento das concentrações de progesterona, o que ocorre antes da ovulação (De Cock *et al.*, 1997; Vermeirsch *et al.*, 1999). Contudo, De Cock *et al.* (1997), mostraram que essa diminuição é menos pronunciada nas células epiteliais das glândulas basais do que nas restantes células do endométrio. Nas outras espécies, como por exemplo na gata, é durante o estro que se verificam os maiores níveis de RE. Pensa-se que a acção de progesterona é preponderante uma vez que parece ocorrer uma diminuição dos RE após administração de progesterona, com ou sem administração concomitante de estradiol (Lessy *et al.*, 1981 citado por Vermeirsch *et al.*, 1999). Contrariamente a estes autores, Fernandes *et al.* (1989), observaram que a concentração dos receptores de estradiol no endométrio é relativamente elevada até ao dia 10 de diestro, o que poderá ser reflectido numa menor acção da progesterona. Do dia 10 até ao dia 40 de diestro, a concentração dos receptores de estradiol no endométrio diminui (Fernandes *et al.* 1989).

Vermeirsch *et al.*, (1999) verificaram que durante a fase lútea, a expressão dos RE encontra-se diminuída em todos os grupos celulares o que se deve provavelmente à elevada concentração de progesterona. No final do diestro, a diminuição da concentração de progesterona está associada a um novo aumento da expressão dos RE, que se mantém relativamente elevada durante o anestro (Fernandes *et al.* 1989; Vermeirsch *et al.*, 1999). Os níveis elevados de RE que se verificam no final do diestro e durante o anestro na cadela estão de acordo com os resultados obtidos em estudos realizados na mulher durante a menopausa (Vermeirsch *et al.*, 1999). Poderia-se assumir uma ausência de receptores na ausência de estímulo hormonal. No entanto, na cadela, durante o anestro pequenas

elevações FSH são capazes de produzir ondas de crescimento folicular com consequente produção de estradiol pelos folículos (Vermeirsch *et al.*, 1999). Para além disso, na mulher o catabolismo do estradiol está reduzido no final da fase secretora; o mesmo pode acontecer na cadela, o que pode levar ao aumento das concentrações de estradiol com consequente aumento dos RE (Vermeirsch *et al.*, 2000).

Em relação aos RP, as variações que ocorrem ao longo do ciclo éstrico são semelhantes às verificadas para os RE. Contudo, existem algumas diferenças: a diminuição da expressão dos RE que ocorre no início do diestro é mais acentuada do que a verificada nos RP; no final do diestro, a expressão dos RE aumentam enquanto, que a dos RP ainda está a diminuir; ao nível das glândulas basais, o nível mais baixo de expressão dos RE é maior que o verificado para as restantes células enquanto, que o nível mínimo de RP se verifica nestas células durante o anestro (Vermeirsch *et al.*, 2000).

O estudo realizado por Vermeirsch *et al.* (2000) não mostrou uma correlação entre a expressão dos RP e os níveis séricos de progesterona mas sim com o rácio estradiol:progesterona. O efeito combinado das duas hormonas (efeito positivo do estradiol e negativo da progesterona) parece ter um maior impacto na regulação da expressão dos RP. Contudo, o efeito inibitório da progesterona pode estar ausente quando estão presentes níveis baixos de progesterona ou níveis elevados de estradiol como o verificado no início do estro (Vermeirsch *et al.*, 2000).

Tanto para os RE como para os RP, as células do estroma mostram uma maior expressão de ambos os receptores em comparação com as células epiteliais. A interacção entre estes dois grupos celulares pode ser crucial na regulação das alterações cíclicas do endométrio, podendo as células epiteliais sofrerem alterações dependentes das hormonas esteróides, quando os receptores estão apenas presentes nas células do estroma (Vermeirsch *et al.*, 1999; Vermeirsch *et al.*, 2000).



#### 4. APOPTOSE – MECANISMO DA MORTE CELULAR PROGRAMADA

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem de uma interacção entre as células que os constituem (Meier *et al*, 2000). As inúmeras comunicações intercelulares que caracterizam as avançadas formas de vida não poderiam funcionar sem um mecanismo capaz de remover as células que já não são necessárias ou que não funcionam correctamente (Vinatier *et al*, 1996). Por exemplo, durante o desenvolvimento embrionário, muitas células são produzidas em excesso e depois são eliminadas, o que contribui para a formação de órgãos e tecidos (Saikumar *et al*, 1999; Meier *et al*, 2000).

Tão importante como a divisão celular, a morte celular permite ao organismo um controlo rígido do número de células e do tamanho dos tecidos, bem como a remoção de células desnecessárias e potencialmente perigosas (Vinatier *et al*, 1996; Hengartner, 2000). Contudo, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos uma vez que os organismos são capazes de induzir morte celular programada como resposta a estímulos intra e ou extracelulares (Hengartner, 2000).

Em 1964 foi proposto o termo “morte celular programada” para designar um tipo de morte que ocorre de forma não acidental onde as células seguem uma sequência de eventos que culmina na sua própria destruição, o que implica a activação de um programa de morte pré-existente codificado no genoma (Vaux & Strasser, 1996; Lockshin & Zakeri, 2001).

Mais tarde, em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular. Referem a apoptose como um mecanismo de morte celular controlada que desempenha um papel complementar mas oposto ao da mitose na regulação das populações de células animais, que pode ser iniciado ou inibido por vários estímulos ambientais, tanto fisiológicos como patológicos (Kerr, Wyllie & Currie, 1972). O termo “apoptose”, sugerido pelo Professor James Cormack da Universidade de Aberdeen, deriva de uma palavra grega que se refere à queda das folhas das árvores ou das pétalas das flores, como comparação à morfologia específica deste tipo de morte celular (Kerr, Wyllie & Currie, 1972; Saikumar *et al*, 1999).

A apoptose tem um papel biológico importante no desenvolvimento e homeostase das populações celulares e ainda na patogénese e expressão de processos patológicos. Participa em inúmeras situações fisiológicas como a formação de cavidades e eliminação de estruturas durante o desenvolvimento embrionário, deleção de células das criptas intestinais e ainda nas alterações do endométrio durante o ciclo éstrico.

Apoptose em excesso ou insuficiente contribui para a patogénese de uma grande variedade de doenças relacionadas com isquémia, neurodegenerescência, autoimunidade, infecções virais e está envolvida no crescimento e regressão de tumores (Saikumar *et al.*, 1999; Vermeulen *et al.*, 2005; Anazeti & Melo, 2007).

#### **4.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES DA APOPTOSE**

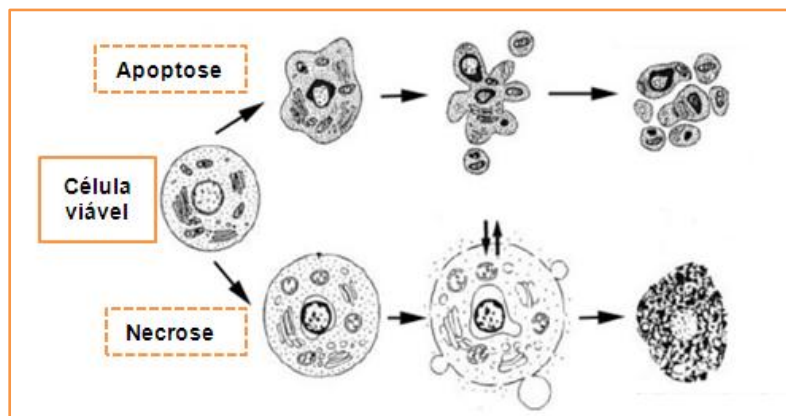
A apoptose é reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De um modo geral é um fenómeno bastante rápido caracterizado por retracção celular que causa perda de adesão com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, formação de projecções em forma de bolha da membrana celular e desintegração do núcleo em fragmentos envoltos pelo involucro nuclear. As projecções da membrana celular aumentam em número e tamanho e acabam por se destacar, originando estruturas que contêm conteúdo celular e se denominam corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por macrófagos e assim removidos sem causar um processo inflamatório (Saikumar *et al.*, 1999; Saraste & Pulkki, 2000; Ziegler & Groscurth, 2004; Vermeulen *et al.*, 2005). Outra explicação para o facto de a apoptose não desencadear reacção inflamatória é o facto das células em apoptose terem capacidade de desencadear uma cascata de sinais bioquímicos anti-inflamatórios nos macrófagos que entram em contacto com elas, nomeadamente a produção de citocinas anti-inflamatórias (Amarante-Mendes, 2003).

A apoptose pode ser diferenciada de outras formas de morte celular, como a necrose que geralmente ocorre como resposta a toxinas, estímulos físicos ou isquémia (Saikumar *et al.*, 1999) (Figura 3).

Ao contrário da apoptose, a necrose é um processo passivo de morte celular, sem a existência de um mecanismo regulador intrínseco. Na necrose há aumento do volume celular, lise da cromatina (cariólise), desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Uma vez que este mecanismo envolve um grande número de células e que estas libertam precocemente o seu conteúdo citoplasmático para o espaço extracelular, os tecidos necróticos provocam uma intensa reacção inflamatória (Saikumar *et al.*, 1999; Van Cruchten & Van den Broeck, 2002; Ziegler & Groscurth, 2004; Vermeulen *et al.*, 2005).

Ao contrário da apoptose, não é necessária energia para que ocorra necrose (Saikumar *et al.*, 1999; Vermeulen *et al.*, 2005).

**Figura 3** - Características morfológicas da apoptose e necrose.



**Legenda** - Na apoptose ocorre retracção celular que causa perda da adesão com a matriz extracelular e células vizinhas; há condensação da cromatina; a membrana celular forma projecções em forma de bolha e o núcleo desintegra-se em fragmentos envoltos pela membrana nuclear; as projecções da membrana celular aumentam de número e tamanho e acabam por se destacar originando corpos apoptóticos que são fagocitados sem causar reacção inflamatória. Na necrose há aumento do volume celular, lise da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular (Adaptado de Van Cruchten & Van den Broeck, 2002 e Grivicich *et al.*, 2007).

Outra particularidade muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação do DNA, a qual possui um padrão característico: uma endonuclease é activada e produz fragmentos de tamanhos variáveis mas sempre múltiplos de 180-200 pares de bases (Vaux & Strasser, 1996; Vinatier *et al.*, 1996; Saraste & Pulkki, 2000; Grivicich *et al.*, 2007). A demonstração da fragmentação do DNA foi um grande avanço no reconhecimento da apoptose celular, estando descritos vários métodos para a sua detecção como a electroforese e o TUNEL (Saraste & Pulkki, 2000; Van Cruchten & Van den Broeck, 2002).

A apoptose pode ser dividida em três fases que são bioquímica e morfologicamente distintas: a primeira, onde a existência de sinais intra ou extra celulares compromete as células ao processo de morte (fase de iniciação); a segunda, onde há activação das proteases intracelulares que executam a morte celular, induzindo as características alterações nucleares (fase efectora); e uma última, onde as células mortas e os corpos apoptóticos são fagocitados e degradados (fase de degradação) (Vaux & Strasser, 1996; Marti *et al.*, 1999; Saikumar *et al.*, 1999; Saraste & Pulkki, 2000).

Em condições fisiológicas, a expressão morfológica da apoptose nos tecidos é um acontecimento raro. Como tal, apenas algumas células em apoptose são observadas num certo instante num determinado local (Saraste & Pulkki, 2000).

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interacção de inúmeros factores. As alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (Saraste & Pulkki, 2000).

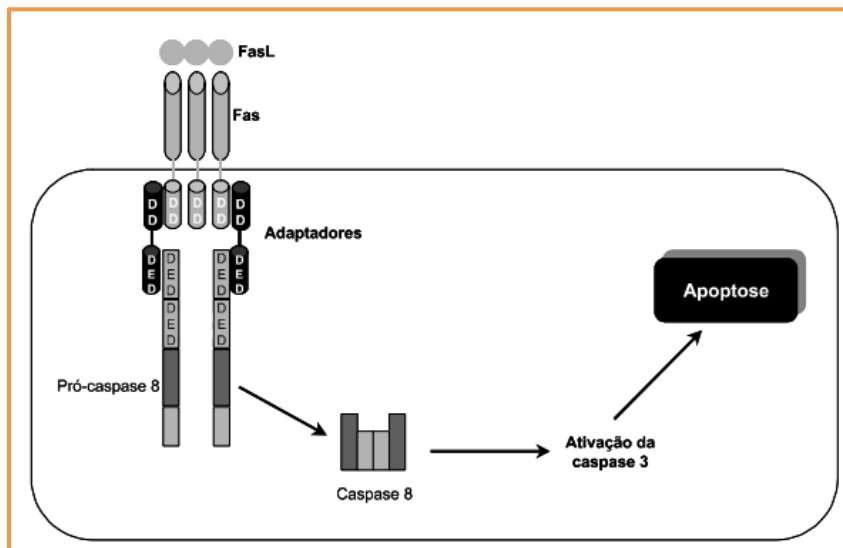
## **4.2. VIAS DE ACTIVAÇÃO DA APOPTOSE**

A activação da apoptose pode ser iniciada por duas vias diferentes: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial).

### **4.2.1. Via extrínseca**

A activação dos mecanismos celulares apoptóticos pode resultar da inactivação de sinais que inibem a apoptose, ou seja, os que são necessários para a sobrevivência da célula, ou por sinais que positivamente conduzem à apoptose através dos chamados “receptores da morte” (*death receptors*) (Saikumar *et al.*, 1999). A via extrínseca é então desencadeada pela ligação de ligantes específicos como o factor de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e o Fas ligante (FasL) a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de factor de necrose tumoral (rTNF), cuja ligação é capaz de activar a cascata de caspases (Saikumar *et al.*, 1999; Hengartner, 2000; Van Cruchten & Van den Broeck, 2002; Grivicich *et al.*, 2007). Outros membros dessa família de receptores são as moléculas Fas (CD95), rTNFI, DR3, DR4, DR5 e DR6 (Amarante-Mendes, 2003). Todos os membros da família rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que reconheçam os seus ligantes. Após a activação dos receptores de morte específicos, a sinalização seguinte é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que se denomina “domínio de morte” (*death domain*) (Van Cruchten & Van den Broeck, 2002; Grivicich *et al.*, 2007). Quando os receptores de morte reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com proteínas adaptadoras como o FADD, que vão recrutar a caspase-8 (Van Cruchten & Van den Broeck, 2002; Amarante-Mendes, 2003; Grivicich *et al.*, 2007). Este complexo formado por um determinado receptor de morte, moléculas adaptadoras e caspase-8 é conhecido como “apoptossoma iniciador”. Neste ambiente molecular, as caspases iniciadoras irão ser activadas e, por sua vez, poderão accionar directamente as caspases executoras (caspase-3) ou gerar sinais que irão actuar na mitocôndria e como tal na via intrínseca (Van Cruchten & Van den Broeck, 2002; Amarante-Mendes, 2003) (Figura 4).

**Figura 4** - Via extrínseca de activação da apoptose.



**Legenda** - DD= Domínio de morte; DED= efector do domínio de morte (Grivicich *et al.*, 2007). Esta via envolve a ligação de ligandos (FasL) a receptores da morte (Fas) que resulta no recrutamento de proteínas adaptadoras e da procaspase-8 que vão activar a caspase-8; esta pode activar directamente as caspases efectoras (caspase-3) que executam a apoptose (Saikumar *et al.*, 1999; Grivicich *et al.*, 2007).

#### 4.2.2. Via intrínseca

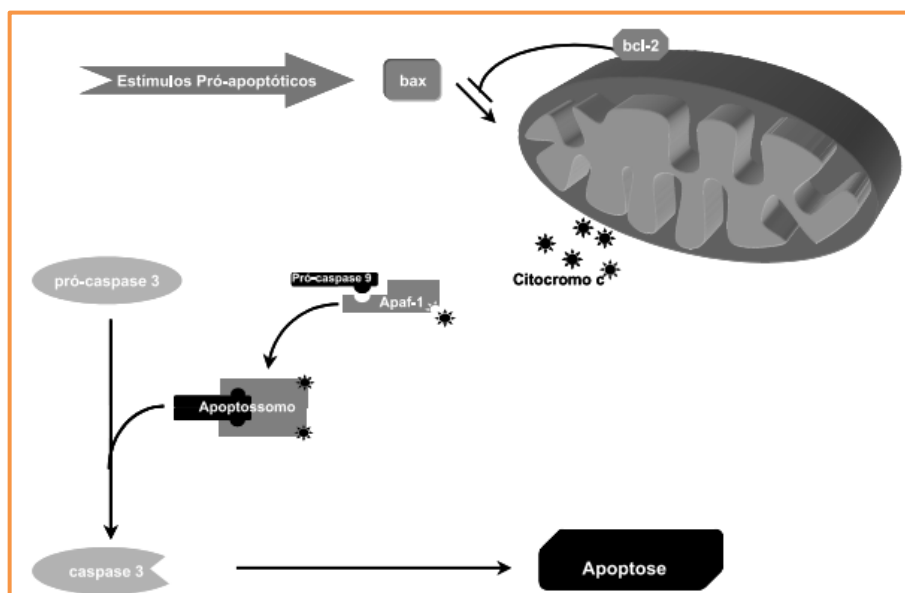
A via intrínseca é activada por uma série de factores que causem stress celular tais como: radiação ultravioleta, agentes quimioterápicos, hipóxia, deficiência em nutrientes ou factores de crescimento, mutações no DNA, entre outros. Os sinais resultantes desse stress são conduzidos principalmente para a mitocôndria, que se pensa ser o centro responsável por este tipo de morte celular (Saikumar *et al.*, 1999; Hengartner, 2000; Van Cruchten & Van den Broeck, 2002; Amarante-Mendes, 2003; Grivicich *et al.*, 2007). Este organelo intracelular integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente libertação de moléculas pró-apoptóticas nele presente (Grivicich *et al.*, 2007). Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial de membrana mitocondrial interna, bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial. Estas alterações para além de conduzirem à mudança do potencial de membrana da mitocôndria com consequente libertação de certas moléculas pró-apoptóticas, levam à perda da homeostasia celular interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reactivas de oxigénio que levam ao dano oxidativo da célula (Van Cruchten & Van den Broeck, 2002; Grivicich *et al.*, 2007).

Os diferentes sinais indutores da apoptose são detectados pela mitocôndria fazendo com que ocorra libertação para o citoplasma do citocromo c e de proteínas activadoras da apoptose como as SMAC/diablo (*Second Mitochondria-derived Activator of*

*Caspases/Direct IAP-Binding protein with a low isoelectric point*) e AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) (Amarante-Mendes, 2003; Grivicich *et al.*, 2007). Uma vez no citoplasma, o citocromo c liga-se a APAF-1 (*Apoptosis proteases activating factor-1*) formando um complexo que, na presença de ATP, activa a caspase-9 que por sua vez activará a caspase-3 e consequentemente a apoptose (Van Cruchten & Van den Broeck, 2002; Amarante-Mendes, 2003; Grivicich *et al.*, 2007). O complexo multimolecular composto por citocromo c, APAF-1, ATP e caspase-9 é chamado “apoptossoma executor”. Por outro lado, SMAC é responsável pelo cancelamento da acção negativa de moléculas da família dos IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) sobre a apoptose (Amarante-Mendes, 2003) e a AIF, uma flavoproteína, migra da mitocôndria para o núcleo e induz a condensação da cromatina e fragmentação do DNA em fragmentos de 50Kb que é independente da activação das caspases (Grivicich *et al.*, 2007).

A família Bcl-2 é uma família de proteínas que participam activamente na regulação da apoptose. Os membros da família Bcl-2, como o Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a libertação do citocromo c e são chamados de reguladores anti-apoptóticos; por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas. A homeostasia é mantida pela relação entre as proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas desta família (Van Cruchten & Van den Broeck, 2002; Grivicich *et al.*, 2007) (Figura 5).

**Figura 5** - Via intrínseca de activação da apoptose.



**Legenda** - Apaf-1=factor de activação da protease associada à apoptose-1; (Grivicich *et al.*, 2007). Nesta via, a libertação do citocromo c pela mitocôndria é devida a vários estímulos pró-apoptóticos que provocam stress celular e é seguido por uma cascata de eventos que culmina com a activação da caspase-9 que irá activar as caspases executoras como a caspase-3 que executa a apoptose (Saikumar *et al.*, 1999).

### 4.3. Caspases como iniciadoras e executoras da apoptose

Apesar das diferentes populações celulares apresentarem características biológicas distintas umas das outras, observa-se uma grande similaridade no fenótipo da apoptose de cada uma delas, mesmo em situações fisiológicas bastantes distintas. Este fenótipo é resultante, principalmente, da acção em cascata de membros de uma família peculiar de cisteíno-aspartato proteases, denominadas caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) (Marti, *et al.*, 1999; Vermeulen *et al.*, 2005; Grivicich *et al.*, 2007). Estas têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (Saraste & Pulkki, 2000, Grivicich *et al.*, 2007). As caspases são sintetizadas como precursores inactivos denominados zimogénios que após a recepção de um sinal de morte celular são activados (Marti, *et al.*, 1999; Saikumar *et al.*, 1999).

As caspases sinalizam para apoptose e, ao clivar os seus substratos, levam à condensação e fragmentação nuclear e à exteriorização de fosfolípidos de membrana que irão permitir que os macrófagos reconheçam e consequentemente fagocitem as células apoptóticas (Grivicich *et al.*, 2007).

Após a recepção de sinais intra ou extracelulares potencialmente apoptóticos, estes são traduzidos por proteínas adaptadoras e transmitidos a "caspases iniciadoras" que comprometem as células à morte celular; de seguida, as alterações celulares ocorrem devido à activação sequencial das chamadas "caspases executoras".

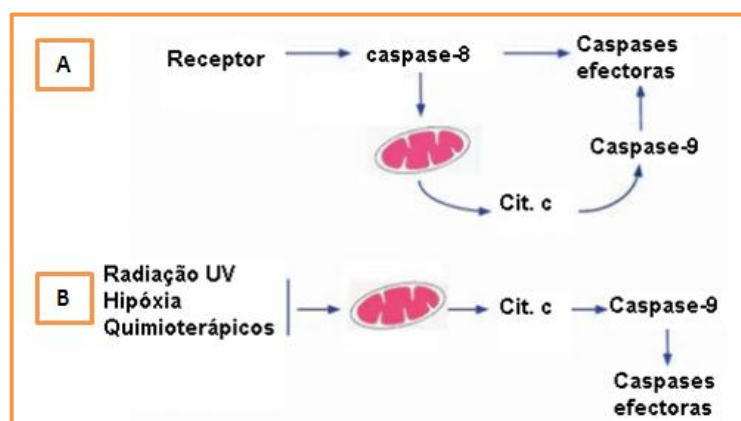
Uma vez iniciada a cascata de caspases, o processo de morte celular é irreversível. (Saikumar *et al.*, 1999).

São conhecidas catorze caspases em mamíferos/humanos, sendo que seis (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10) participam na apoptose (Grivicich *et al.*, 2007).

A activação das caspases promove o aparecimento das alterações celulares que caracterizam a apoptose. Essas alterações são comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo. Isto significa que a acção destas caspases representa uma via final comum que opera em todas as células programadas para morrer (Hengartner, 2000; Anazetti & Melo, 2007).

As duas vias independentes da apoptose (intrínseca e extrínseca) que são activadas de modos diferentes convergem com a activação das caspases executoras (Figura 6) (Saikumar *et al.*, 1999).

**Figura 6** - Convergência das duas vias da apoptose na activação das caspases executoras.



**Legenda – A** - A primeira via envolve a ligação de ligantes a receptores da morte que resulta no recrutamento de proteínas adaptadoras e da procaspase-8 que vão activar a caspase-8; esta pode activar directamente as caspases executoras ou permeabilizar a membrana mitocondrial e permitir a libertação do citocromo c que amplifica o sinal apoptótico. **B** - Na segunda via, a libertação do citocromo c pela mitocôndria ocorre devido a vários estímulos que provocam stress celular e é seguido por uma cascata de eventos que culmina com a activação da caspase-9 que irá activar as caspases executoras (Saikumar *et al*, 1999).

#### 4.4. Apoptose no endométrio da mulher

A apoptose tem um papel fundamental na manutenção da homeostase dos tecidos e representa um mecanismo fisiológico de remoção de células disfuncionais ou em excesso (Song *et al.*, 2002). A morte celular em tecidos hormono-dependentes é um bom exemplo: na glândula mamária das fêmeas e no endométrio, a proliferação do epitélio é seguida da morte dessas células de um modo cíclico; no ovário, a apoptose está envolvida durante a atresia folicular e regressão do corpo lúteo (Marti *et al*, 1999).

Como órgão reprodutivo da fêmea, o útero é caracterizado por ciclos contínuos de proliferação celular do endométrio e de apoptose em resposta a alterações hormonais (Song *et al.*, 2002).

O ciclo éstrico da mulher compreende três fases: proliferativa, secretora e menstrual. Durante a primeira fase ocorre uma intensa proliferação do epitélio luminal do endométrio, que se completa 3 dias após a ovulação. Durante a fase secretória verifica-se a proliferação das células do estroma endometrial. Quanto à apoptose, esta é escassa durante a fase proliferativa, aumenta progressivamente durante a fase secretora e atinge um pico durante a fase menstrual, afectando principalmente as células epiteliais do endométrio. Como tal, a



proliferação e a apoptose ocorrem em dois pólos opostos do ciclo menstrual (Vinatier, *et al.*, 1996).

Estão descritas duas vias no controlo da apoptose: uma envolve as proteínas do grupo bcl-2 (bcl-2 e bax) que integram a via mitocondrial; a outra envolve os receptores do grupo do TNF (como o Fas), na qual os sinais pró-apoptóticos são transmitidos por ligantes específicos como o FasL. Estas vias convergem para uma via final comum, que envolve a activação das caspases responsáveis pelo desenvolvimento de uma cascata proteolítica (Atasoy *et al.*, 2003).

Enquanto que a proteína bcl-2 protege a célula da apoptose, outra proteína do seu grupo, a bax, aumenta a susceptibilidade à apoptose. A análise da expressão destas duas proteínas revela a sua relação com a apoptose, que ocorre ciclicamente ao longo do ciclo éstrico; há expressão da bcl-2 durante a fase proliferativa, que diminui ao longo da fase secretora e é quase nula na fase menstrual; a expressão da bax também decresce após a fase proliferativa, mas continua detectável durante toda a fase secretora. Assim, a diminuição do rácio bcl-2/bax que se verifica no início da fase secretora precede o aumento da apoptose do endométrio (Vaskivuo *et al.*, 2000; Harada *et al.*, 2007).

Apesar de os factores de crescimento e as hormonas estimularem activamente a proliferação e suprimirem a morte celular através de sinais de sobrevivência, a morte celular é eficientemente desencadeada por receptores de membrana (Song *et al.*, 2002). A interacção entre o Fas e o Fas-L é essencial na indução da apoptose. São ambos expressos no endométrio da mulher ao longo do ciclo éstrico, com maior expressão na fase secretória do que na fase proliferativa (Song, 2002; Harada *et al.*, 2007).

## CAPÍTULO I

### PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE CELULAR NO ENDOMÉTRIO NORMAL DURANTE O CICLO ÉSTRICO DA CADELA

#### 1. Introdução e Objectivos

Os órgãos reprodutivos femininos sofrem alterações durante o ciclo éstrico e gestação que estão estreitamente relacionadas com os níveis de hormonas esteróides produzidas pelos ovários (Steffl *et al.*, 2008).

Durante o ciclo éstrico, o endométrio da cadela sofre alterações morfológicas e bioquímicas que estão associadas com a proliferação, a apoptose e a diferenciação celular. O conhecimento destes padrões é importante para o estudo dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da gestação e nas alterações patológicas como o complexo piómetra-hiperplasia quística do endométrio que é comum em cadelas nulíparas (Van Cruchten *et al.*, 2004).

O objectivo do presente estudo foi avaliar e caracterizar o padrão de proliferação e de apoptose celular no endométrio normal de cadela durante o ciclo éstrico.

Para a análise da proliferação celular escolheu-se realizar a detecção imunohistoquímica do antigénio Ki-67, que é uma proteína nuclear exclusivamente expressa pelas células em replicação. O Ki-67 é expresso durante toda a fase mitótica do ciclo celular, excepto no início da fase G<sub>1</sub>; as células em G<sub>0</sub> não expressam este antigénio uma vez que não estão a proliferar.

Já para a análise da apoptose, as células em apoptose foram detectadas *in situ* pelo método TUNEL (*Terminaldeoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-FITC Nick End-Labeling*), que marca especificamente a fragmentação do DNA nuclear característica deste tipo de morte celular.

#### 2. Material e métodos

##### 2.1. Animais

Para este estudo foram utilizados quarenta e quatro úteros de cadelas saudáveis submetidas a ovariectomia (OVH) de rotina. Para caracterizar melhor cada animal, foram recolhidos dados relativos à anamnese, idade, raça, peso, existência de alguma gestação prévia, data do último cio e ainda realizada uma breve análise macroscópica do aparelho genital da cadela. As cadelas apresentaram idades compreendidas entre os 6

meses e os 10 anos de idade (média de 3 anos) e na sua maioria eram de raça indeterminada.

As OVHs foram realizadas no serviço de cirurgia do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HEFMV), no Hospital Veterinário da Estefânia (HVE), na Liga Portuguesa dos Direitos do Animal (LPDA) e no Canil Municipal de Sintra (CMS).

### **2.1.1. Colheita de Amostras**

Em cada animal, antes da realização da cirurgia, foi realizada uma zaragatoa vaginal para citologia e foi colhido aproximadamente 5 mL de sangue para tubo seco.

Imediatamente após a OVH, com auxílio de material cirúrgico estéril foram colhidas amostras de cada corno uterino (porção cranial e caudal) e ambos os ovários, e seguidamente colocadas em formol tamponado (Formaldeído 4% pH6.9, Merck KGaA, 1.00496.9010, Darmstadt, Alemanha) durante 24h. O volume de formol utilizado foi aproximadamente 50 vezes o volume do fragmento a fixar (Aughey & Frye, 2001; Junqueira & Carneiro, 2005).

Posteriormente, os fragmentos obtidos já fixados foram cortados e processados para inclusão em parafina, utilizando um processador de tecidos LEICA TP 1020. Após a inclusão, foram realizados cortes com 4µm por intermédio dum micrótomo e efectuou-se a coloração dos mesmos com Hematoxilina & Eosina (H&E) (Hematoxylin Solution Gill No2, Accustain®, GHS280, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA; Eosin Y Solution Alcoholic with Phloxine, Accustain®, HT110380, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) para posterior análise histológica. O processamento foi executado no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL).

As citologias vaginais, obtidas através de um esfregaço por aposição de uma zaragatoa vaginal, foram secas ao ar, coradas com giemsa (Giemsa stain modified, Accustain®, GS1L-1L, Sigma Aldrich, St Louis, EUA) e posteriormente montadas com entellan (Entellan®, Merck KGaA, 1.07961.0500, Darmstadt, Alemanha).

As amostras de sangue foram centrifugadas (10 min. x 3000g) e o soro armazenado a -20°C em *eppendorfs* até ao seu posterior processamento.

### **2.1.2. Caracterização das Amostras**

A fase do ciclo éstrico de cada uma das cadelas foi determinada com base na análise microscópica da citologia vaginal, no doseamento de progesterona sérica e na avaliação macroscópica e histológica do útero e ovários.

A análise da citologia vaginal foi realizada com base nas alterações quantitativas e qualitativas da chave celular (células basais/parabasais, intermédias, células superficiais

queratinizadas com núcleo picnótico e células superficiais queratinizadas sem núcleo, vulgarmente designadas por escamas).

O doseamento de progesterona foi efectuado sem extracção de amostra por quimioluminescência (Immulite 1000, Siemens Healthcare Diagnostics, Lda., Amadora, Portugal), utilizando um kit disponível comercialmente (Immulite 1000 Progesterone Kit, Siemens). O coeficiente de variação inter-ensaio para o controlo CON4 (1,66 ng/mL), CON5 (3,8 ng/mL) e CON6 (14,2 ng/mL) variou entre 2-4% (Multivalent Control Module, Siemens). Este procedimento decorreu no Laboratório de Endocrinologia da FMV-UTL.

A avaliação macroscópica do útero e ovários teve como objectivo avaliar a morfologia do útero bem como identificar as estruturas existentes nos ovários nomeadamente folículos, corpos hemorrágicos, corpos lúteos, corpos *albicans*. Através da análise histológica, foi possível uma caracterização mais minuciosa das estruturas celulares, nomeadamente do epitélio luminal e glandular ao nível do endométrio. Deste modo, com base nas alterações histológicas que o endométrio sofre ao longo do ciclo éstrico descritas por Rehn *et al.* (2007) e por Chandra *et al.* (2008), foi possível identificar cada fase do ciclo.

Com base nos resultados obtidos, as amostras foram classificadas em nove fases: início proestro, meio proestro, fim proestro, estro, início diestro I (0-10dias), início diestro II (11-30dias), meio diestro, fim diestro e anestro (Tabela 1).

**Tabela 1** - Parâmetros usados na determinação da fase do ciclo éstrico de cada cadela.

Fase do ciclo éstrico	Nº de cadelas	Morfologia uterina	Estruturas ováricas	Citologia vaginal	[P <sub>4</sub> ] (ng/mL)
<b>Proestro (início, meio, fim)</b>	2, 4, 3	Fase proliferativa	Folículos em crescimento	< 80% células superficiais queratinizadas	<1
<b>Estro</b>	7	Fase proliferativa	Folículos maduros ou corpo lúteo em crescimento.	> 80% células superficiais queratinizadas	1-20
<b>Início de diestro I (0-10 dias)</b>	5	Fase proliferativa	Corpo lúteo em crescimento ou crescimento completo.	Células intermédias e parabasais agrupadas, cél. de metaestro e espumosas, PMN	>20
<b>Início de diestro II (11-30 dias)</b>	5	Fase secretora	Corpo lúteo crescimento completo	Células intermédias e parabasais	>20
<b>Meio de diestro</b>	5	Fase secretora	Corpo lúteo em regressão	Células intermédias e parabasais	20-10
<b>Fim de diestro</b>	8	Fase secretora	Corpo lúteo em regressão	Células intermédias e parabasais	3,14 - 1
<b>Anestro</b>	5	Fase de quiescência	Corpo <i>albicans</i>	Células intermédias pequenas e células basais	<1

## 2.2. Marcação por imunohistoquímica do Ki-67

A proliferação celular foi avaliada por imunohistoquímica após marcação com o anticorpo Ki-67.

Foram realizados cortes histológicos (4 µm) consecutivos do tecido e montados em lâminas Superfrost® (Menzel Glaeser, D-38116 Braunschweig, Alemanha). Posteriormente foram desparafinizados, rehidratados e lavados em água corrente durante 5 minutos.

A detecção imunohistoquímica foi efectuada pelo método da imunoperoxidase. Como tal, para bloquear a actividade da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas numa solução de 0,3% de peróxido de hidrogénio (Suprapur®, Hydrogen peroxide 30%, Merck KGaA, 1.07298.0250, Darmstadt, Alemanha) em metanol (EMSURE®, Methanol for analysis, Merck KGaA, 1.06009.2511, Darmstadt, Alemanha) durante 30 minutos.

De seguida, para recuperação antigénica as lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH=6; 0,1M ácido cítrico pH=1,8 e 0,1M citrato de sódio pH=8,8) durante 5 minutos à temperatura ambiente, posteriormente submetidas a radiação microondas durante 15 minutos (700W) e depois arrefecidas à temperatura ambiente durante 20 minutos. Seguidamente as lâminas foram lavadas em TBS/0,3% Triton X pH=7.2-7.4 (tampão TBS pH=7,476 - 50mM tris-HCl e 150mM NaCl) durante 5 minutos e incubadas numa solução bloqueadora (Histostain® - Plus Bulk Kit Zymed® 2<sup>nd</sup> Generation, 85-9043, Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, EUA) durante 30 minutos à temperatura ambiente de forma a bloquear os locais de ligação inespecíficos.

Após a solução de bloqueio, as lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário Ki-67 (1:100, Ki-67 Monoclonal Mouse anti-human, clone Mib1, M7240, Dako, Glostrup, Dinamarca) diluído em TBS.

No dia seguinte, após lavagem em TBS, as lâminas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (Histostain®-Plus Bulk Kit Zymed® 2<sup>nd</sup> Generation) e novamente lavadas durante 10 minutos em TBS. De seguida, para ocorrer a reacção colorimétrica, foi adicionado o substrato DAB (DAB kit, Zytomed Systems, 00-2014, Berlim, Alemanha) de acordo com as indicações do fabricante.

Por último, após lavagem em água corrente durante 5 minutos, as lâminas foram coradas com hematoxilina (Mayer's hemalum solution, 1.09249.2500, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e novamente passadas por água corrente. Posteriormente foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol até xilol e montadas com entellan (Entellan®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

Foram feitos dois controlos negativos, substituindo o anticorpo primário pelo isotipo correspondente (anticorpo monoclonal Mab IgG1) (Purified mouse IgG1 K isotype control

clone MOPC-31C, BD Pharmigen™, 550878, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) em igual concentração ou por TBS.

### 2.3. TUNEL

Para a avaliação da apoptose celular usou-se o método TUNEL. O protocolo utilizado foi o descrito pelo fabricante (ApoptTag® Plus Peroxidade In Situ Apoptosis Detection Kit, S7100, Millipore), apenas com algumas modificações.

Após inclusão em parafina de secções dos cornos uterinos e dos ovários, foram realizados cortes histológicos (4 micra) consecutivos do tecido e montados em lâminas Superfrost® (Menzel Glaeser, D-38116, Braunschweig, Alemanha). Posteriormente foram desparafinizados, rehidratados e lavados em água corrente durante 5 minutos.

Num primeiro passo, as lâminas foram incubadas com uma solução de proteinase K (20µg/mL) (Proteinase K recombinante, PCR grade lyophilized, Roche, 03.115.836.001, Alemanha) durante 15 minutos à temperatura ambiente e depois lavadas em água destilada 2x2 minutos. De seguida foram incubadas numa solução de 3% de peróxido de hidrogénio (Suprapur®, Hydrogen peroxide 30%, Merck KGaA, 1.07298.0250, Darmstadt, Alemanha) durante 5 minutos, lavadas 2x5 minutos em PBS (pH= 7,476; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7mM KCl e 137mM NaCl) e incubadas durante 10 segundos com *Equilibration Buffer* (kit ApoptTag®). Depois, as lâminas foram incubadas a 37°C em câmara húmida durante 1 hora com a enzima TdT (kit ApoptTag®) e de seguida colocadas numa solução tampão *Stop/Wash Buffer* (kit ApoptTag®) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem em PBS (3x1 min), as lâminas foram incubadas com anti-digoxigenina-peroxidase (kit ApoptTag®) durante 30 minutos em câmara húmida à temperatura ambiente e de seguida lavadas 4x2 minutos em PBS. Seguidamente, para a ocorrer a reacção colorimétrica, foi adicionado o substrato DAB (kit ApoptTag®) de acordo com as indicações do kit ApoptTag® Plus Peroxidade *In Situ* Apoptosis Detection.

Por último, após lavagem em água corrente durante 5 minutos, as lâminas foram coradas com hematoxilina (Mayer's hemalum solution, 1.09249.2500, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e novamente passadas por água corrente. Posteriormente foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol até xilol e montadas com entellan (Entellan®, Merck KGaA, 1.07961.0500, Darmstadt, Alemanha).

Como controlo positivo foram utilizados cortes histológicos de glândula mamária de fêmea de rato, fornecidos pelo kit.

## 2.4. Análise quantitativa

Os resultados de proliferação e de apoptose foram obtidos através da análise microscópica (Microscópio Olympus CH30, Japão), por parte de três observadores, de 500 células de cada um dos seguintes compartimentos: epitélio luminal, epitélio das criptas, vasos sanguíneos, estroma e epitélio das glândulas basais, numa ampliação de 400x.

Para a análise da proliferação celular, calculou-se um índice correspondente à percentagem de células positivas à marcação com o Ki-67 em cada um dos compartimentos celulares e ao longo de cada fase do ciclo éstrico. Foi considerada marcação positiva as células com núcleo marcado a castanho.

Os índices da apoptose celular foram determinados através da contagem do número de células positivas em cada um dos compartimentos celulares, sendo classificados em 5 níveis conforme descrito por Chu *et al.* (2006) e ilustrado na Tabela 2. Esta classificação foi realizada para reduzir o erro associado a esta contagem, uma vez que é muitas vezes difícil individualizar as células desintegradas. Foi considerada marcação positiva as células com núcleo marcado a castanho, bem como as células com corpos apoptóticos no citoplasma e ainda as que possuíam aspectos morfológicos característicos deste tipo de morte celular.

**Tabela 2** – Classificação por índices de apoptose (Adaptado de Chu *et al* (2006)).

Índice	Nº células positivas
0	0
1	1-20
2	21-40
3	41-60
4	>60

## 2.5. Análise estatística

Os dados foram analisados recorrendo ao programa STATISTICA *for Windows* (Statistica 5.0, StatSoft Inc, Tulsa, EUA, 1995).

Após verificação da normalidade da distribuição da população, os dados foram transformados ( $\log x + 1$ ) e avaliados utilizando o teste *Mann-Whitney U-test*. O nível de significância escolhido foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. Resultados

#### 3.1. Progesterona

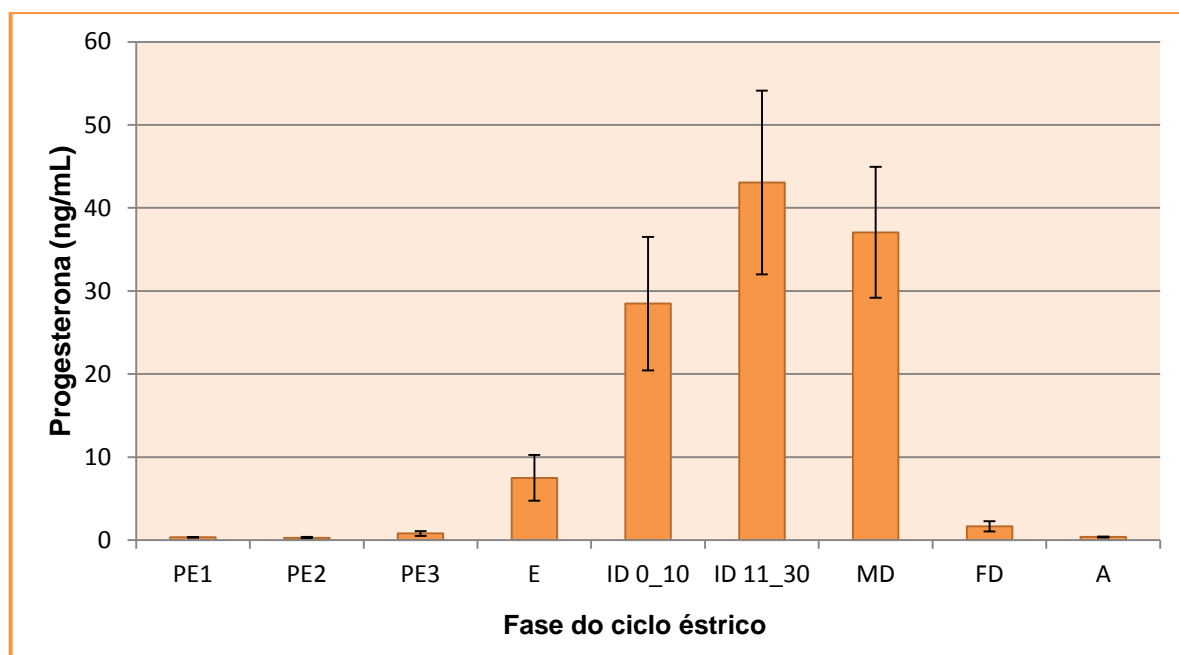
Neste estudo, as concentrações de progesterona observadas ao longo das diferentes fases do ciclo éstrico das cadelas em estudo encontram-se representados no Gráfico 1.

O aumento das concentrações de progesterona observadas durante o estro resulta da luteinização precoce das células dos folículos ováricos que ocorre antes da ovulação.

As concentrações mais elevadas verificam-se na primeira metade do diestro especialmente entre os 11-30 dias. Após este período os valores começam a diminuir devido à regressão do corpo lúteo, até retornarem a valores basais no anestro.

No anestro e durante o proestro as concentrações de progesterona são basais (<0,5 ng/mL).

**Gráfico 1** – Concentrações séricas de progesterona das cadelas em estudo, conforme as várias fases do ciclo éstrico.



**Legenda:** PE1 – Início do proestro; PE2 – Meio do proestro 2; PE3 – Fim do proestro 3; E – Estro; D0-10 – Diestro dos 0 aos 10 dias; D11-30 – Diestro dos 11 aos 30 dias; MD - Meio de diestro; FD – Fim de diestro; A – Anestro.



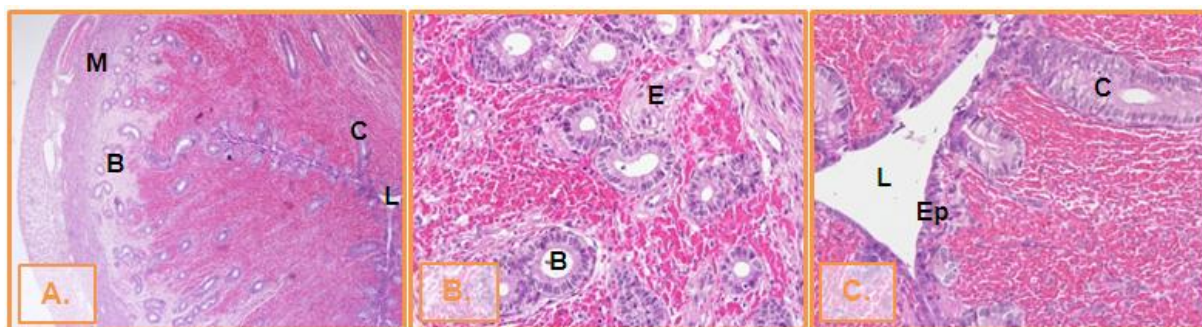
### 3.2. Análise histológica do útero

Em cortes histológicos dos cornos uterinos corados com H&E foi feita a caracterização das alterações morfológicas que ocorrem no endométrio ao longo do ciclo éstrico.

Durante o proestro, o estroma do endométrio apresenta-se cada vez mais edematoso, o que confere ao lúmen a forma de cruz ou “X” em corte transversal do útero. O estroma é ainda marcado por uma intensa congestão e hemorragia. O epitélio luminal prolifera formando invaginações no estroma que originam as criptas (Figura 7). Este epitélio, inicialmente cúbico, passa a cilíndrico no final do proestro.

Durante o proestro, observa-se um aumento do número de glândulas basais. No final do proestro, o epitélio das glândulas basais também se torna cilíndrico.

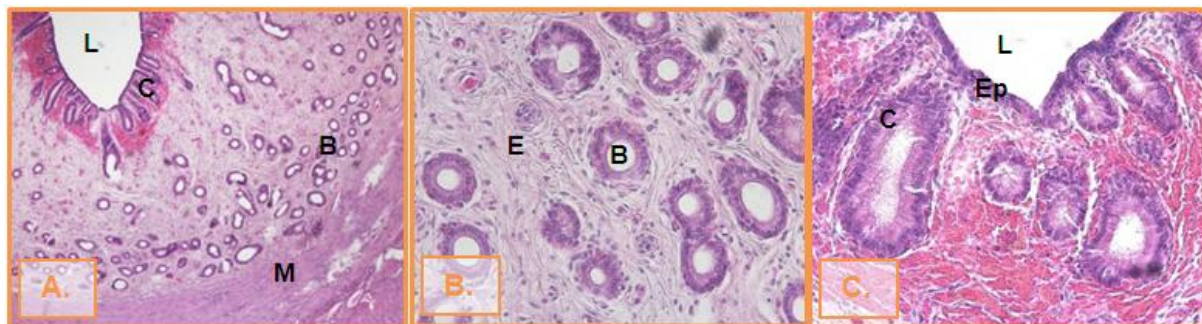
**Figura 7** – Proestro - cortes histológicos de útero (coloração H&E).



**Legenda:** A. – Endométrio e miométrio (40x); B. – Glândulas basais do endométrio (200x); C. – Epitélio luminal e criptas do endométrio (200x). B – Glândula Basal; C – Cripta; E – Estroma; Ep – Epitélio luminal; L – Lúmen uterino; M – Miométrio (coloração H&E).

No início do estro o endométrio ainda se apresenta edematoso. Contudo, após a ovulação, há redução desse edema, aumento do colagénio no estroma e as glândulas tanto basais como as das criptas tornam-se mais desenvolvidas (Figura 8).

**Figura 8** - Estro - cortes histológicos de útero (coloração H&E).



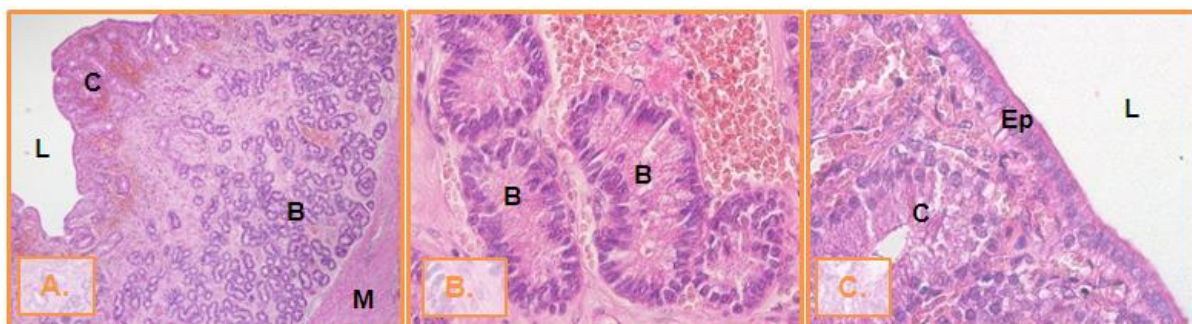
**Legenda:** A. – Endométrio e miométrio (40x); B. – Glândulas basais do endométrio (200x); C. – Epitélio luminal e criptas do endométrio (200x). B – Glândula Basal; C – Cripta; E – Estroma; Ep – Epitélio luminal; L – Lúmen uterino; M – Miométrio (coloração H&E).

No início do diestro, o endométrio atinge a maior espessura e densidade celular de todo o ciclo éstrico. O estroma possui uma rede densa de colagénio e as glândulas basais têm uma aparência enrolada que é bastante distinta da morfologia das criptas (Figura 9). No início do diestro, as células epiteliais das criptas são altas e com núcleos fracamente basófilos; com o avançar desta fase, o citoplasma torna-se vacuolizado devido à acumulação lipídica.

A partir da terceira semana de diestro inicia-se o processo de regressão uterina, cujas alterações são marcadas pela passagem do epitélio glandular basal de cilindro a cúbico e pela perda de colagénio ao nível do estroma (Figura 10).

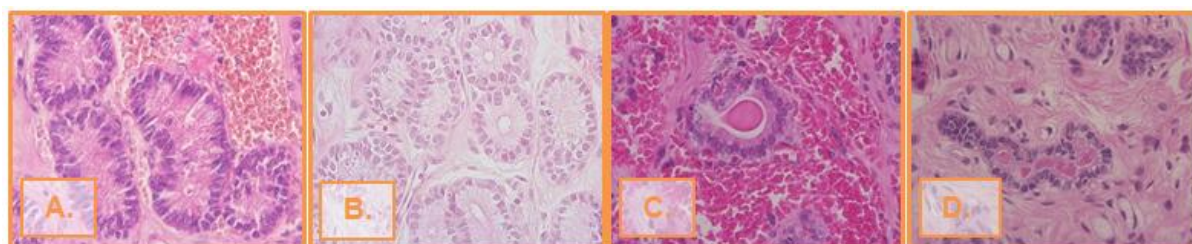
O final do diestro é ainda caracterizado por uma marcada degenerescência das células do epitélio luminal que apresentam o citoplasma vacuolizado e o núcleo picnótico (Figura 11).

**Figura 9** – Início de diestro (0-10dias) - cortes histológicos de útero (coloração H&E).



**Legenda:** A. – Endométrio e miométrio (40x); B. – Glândulas basais do endométrio (400x); C. – Epitélio luminal e criptas (400x). B – Glândulas Basais; C – Cripta; Ep – Epitélio luminal; L – Lúmen uterino; M – Miométrio (coloração H&E).

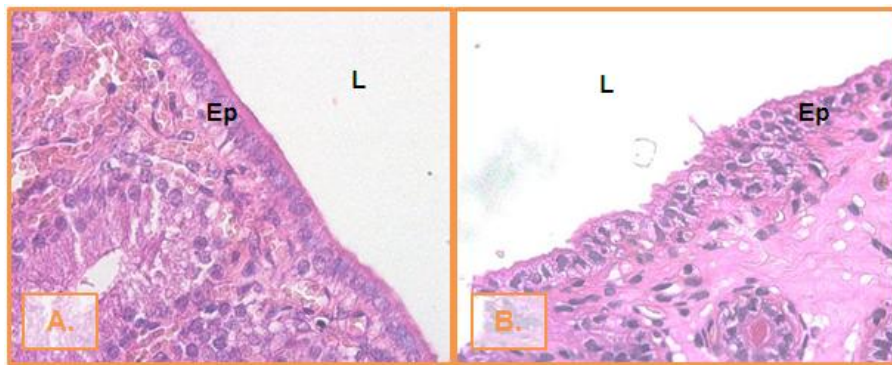
**Figura 10** – Glândulas basais do endométrio durante o diestro - cortes histológicos de útero (coloração H&E).



**Legenda:** A. – Glândulas basais do endométrio nos primeiros 10 dias de diestro (400x); B. – Glândulas basais do endométrio entre os 11 e 30 dias de diestro (400x); C. – Glândulas basais do endométrio no meio de diestro (400x); D. – Glândulas basais do endométrio no final do diestro (400x) (coloração H&E).



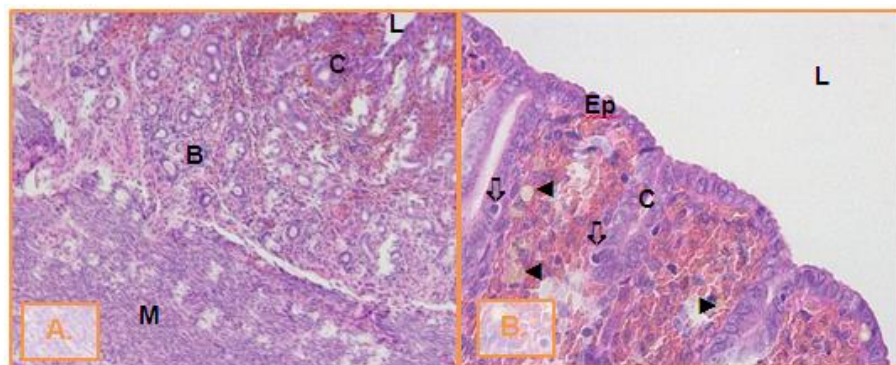
**Figura 11** – Epitélio luminal do endométrio durante o diestro - cortes histológicos de útero (coloração H&E).



**Legenda:** A. – Epitélio luminal do endométrio nos primeiros 10 dias de diestro (400x); B. – Epitélio luminal do endométrio no final de diestro (400x). Ep – Epitélio luminal (coloração H&E).

No anestro, o endométrio está atrofiado e a redução do citoplasma das células resulta numa alta densidade nuclear (Figura 12A.). Nesta fase e ainda no final do diestro, após a degenerescência do epitélio, é visível um aumento do número de macrófagos e linfócitos ao nível do estroma, principalmente na região adjacente ao epitélio luminal (Figura 12B.).

**Figura 12** - Anestro - cortes histológicos de útero (coloração H&E).



**Legenda:** A. - Endométrio e miométrio (100x); B. – Epitélio luminal e criptas (400x). B – Glândulas Basais; C – Criptas; Ep – Epitélio luminal; L – Lúmen uterino; M – Miométrio; ◄ - Macrófagos; ⇨ - Linfócitos.

### 3.3. Avaliação do índice de proliferação celular

Durante todas as fases do ciclo éstrico foram encontradas células positivas para o Ki-67. Contudo, observaram-se diferenças da expressão do Ki-67 ao longo do ciclo éstrico nos vários grupos celulares do endométrio.

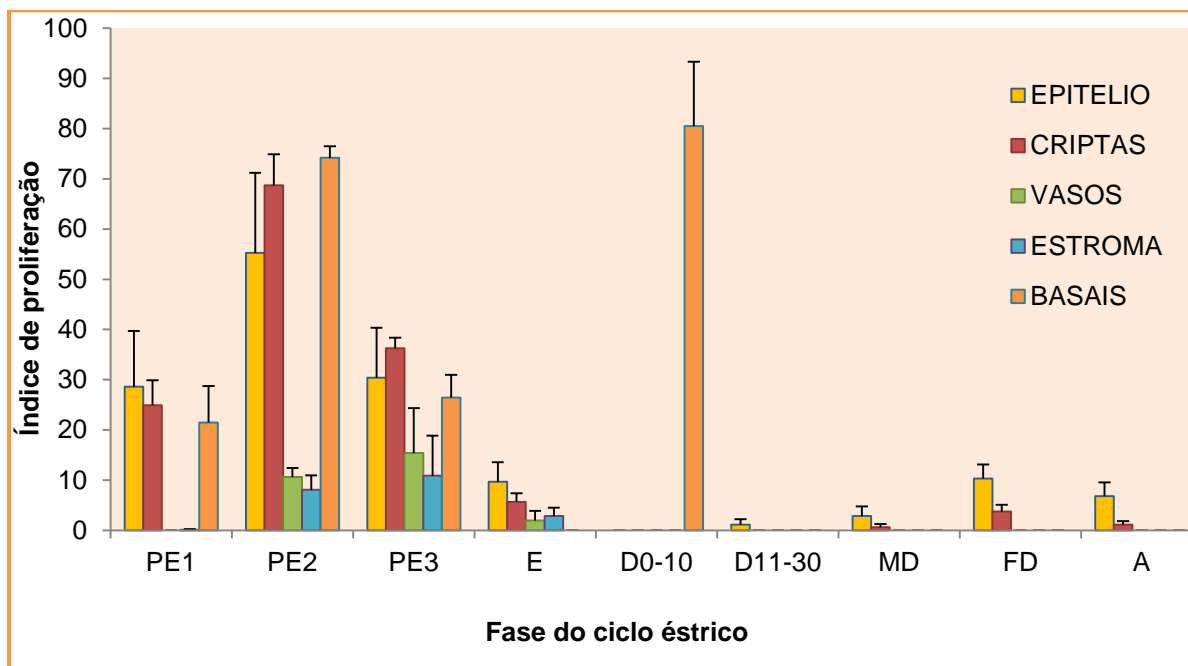
Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 3 e no Gráfico 2.

**Tabela 3** – Índices de proliferação dos diferentes tipos celulares no endométrio ao longo do ciclo éstrico da cadela (média e erro padrão).

	PE1	PE2	PE3	E	D0-10	D11-30	MD	FD	A
<b>Epitélio luminal</b>	28,61* (11,12)	55,24 <sup>c</sup> (15,96)	30,40 <sup>c</sup> (9,92)	9,71 <sup>b</sup> (3,87)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	1,13 <sup>a</sup> (1,13)	2,87 <sup>ab</sup> (1,91)	10,36 <sup>b</sup> (2,76)	6,80 <sup>b</sup> (2,76)
<b>Criptas</b>	24,90* (5,02)	68,69 <sup>d</sup> (6,22)	36,30 <sup>c</sup> (2,04)	5,70 <sup>b</sup> (1,68)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,64 <sup>ab</sup> (0,64)	3,74 <sup>b</sup> (1,38)	1,17 <sup>b</sup> (0,66)
<b>Vasos</b>	0,00* (0,00)	10,62 <sup>b</sup> (1,80)	15,43 <sup>b</sup> (8,91)	1,95 <sup>a</sup> (1,95)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)
<b>Estroma</b>	0,14* (0,14)	8,11 <sup>b</sup> (2,85)	10,87 <sup>b</sup> (7,98)	2,89 <sup>ab</sup> (1,65)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)
<b>Glândulas basais</b>	21,50* (7,23)	74,21 <sup>c</sup> (2,27)	26,47 <sup>b</sup> (4,51)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	80,53 <sup>c</sup> (12,78)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)

**Legenda:** PE1 – Início do proestro; PE2 – Meio do proestro 2; PE3 – Fim do proestro 3; E – Estro; D0-10 – Diestro dos 0 aos 10 dias; D11-30 – Diestro dos 11 aos 30 dias; MD - Meio de diestro; FD – Fim de diestro; A – Anestro. Para cada linha, colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , *Mann-Whitney U-test*). \* Uma vez que o  $n=2$ , esta coluna não foi contabilizada na estatística.

**Gráfico 2** – Índices de proliferação nos vários compartimentos celulares ao longo do ciclo éstrico.



**Legenda:** PE1 – Início do proestro; PE2 – Meio do proestro 2; PE3 – Fim do proestro 3; E – Estro; D0-10 – Diestro dos 0 aos 10 dias; D11-30 – Diestro dos 11 aos 30 dias; MD - Meio de diestro; FD – Fim de diestro; A – Anestro.

No que diz respeito à proliferação celular, foram observados ao longo do ciclo éstrico dois picos de proliferação, um no proestro e outro nos primeiros 10 dias de diestro.

Nas células do epitélio luminal, das criptas, dos vasos sanguíneos e do estroma foram observados maiores índices de proliferação no proestro ( $p < 0,05$ ) (Figura 13). Já nas células epiteliais das glândulas basais observaram-se dois picos de proliferação, um no proestro (Figura 13) juntamente com os restantes grupos celulares, e outro no início do diestro (Figura 15) onde apenas se observa proliferação nessas células ( $p < 0,05$ ) com o índice a rondar os 80%.

As células do endotélio vascular e as células do estroma, apenas apresentaram marcação a partir do meio do proestro, com um índice que ronda os 15% e os 11%, respectivamente, no final do proestro.

Durante o estro (principalmente após a ovulação) e após os primeiros 10 dias de diestro, os índices de proliferação foram baixos em todos os compartimentos celulares.

Entre os 11 e 30 dias de diestro somente nas células do epitélio luminal se verificou proliferação, e mesmo nestas o índice de proliferação foi baixo (cerca de 1%) (Figura 16).

A partir do meio de diestro até ao anestro apenas se encontraram células positiva ao Ki-67 no epitélio luminal e nas criptas (Figura 19; Figura 20).

### 3.4. Avaliação da apoptose

Tal como na avaliação da proliferação, foram encontradas células positivas pela técnica de TUNEL em todas as fases do ciclo éstrico.

Observaram-se igualmente diferenças nos índices de apoptose nos vários grupos celulares do endométrio ao longo do ciclo éstrico.

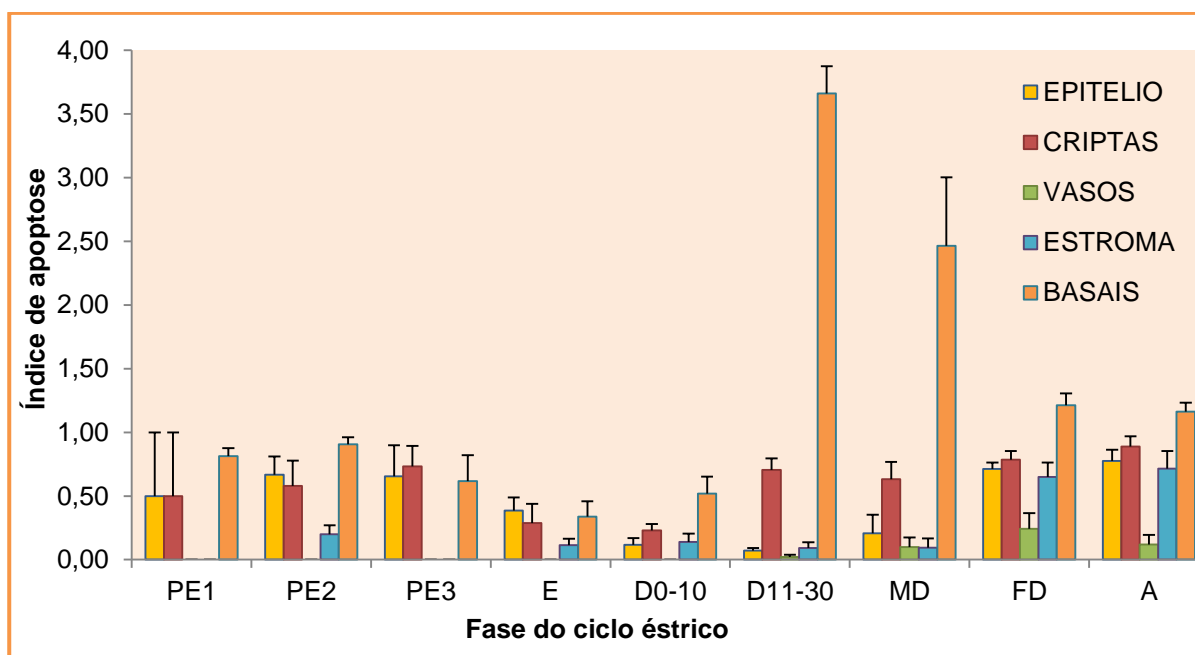
Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 4 e no Gráfico 3.

**Tabela 4** - Índices de apoptose dos diferentes tipos celulares no endométrio ao longo do ciclo éstrico da cadela (média e erro padrão).

	PE1	PE2	PE3	E	D0-10	D11-30	MD	FD	A
<b>Epitélio</b>	0,50* (0,50)	0,67 <sup>c</sup> (0,14)	0,65 <sup>bc</sup> (0,25)	0,38 <sup>bc</sup> (0,10)	0,12 <sup>ab</sup> (0,05)	0,07 <sup>a</sup> (0,02)	0,21 <sup>abc</sup> (0,15)	0,71 <sup>c</sup> (0,05)	0,77 <sup>c</sup> (0,09)
<b>Criptas</b>	0,50* (0,50)	0,58 <sup>ab</sup> (0,20)	0,73 <sup>b</sup> (0,16)	0,29 <sup>ab</sup> (0,15)	0,23 <sup>a</sup> (0,05)	0,71 <sup>b</sup> (0,09)	0,63 <sup>bc</sup> (0,14)	0,79 <sup>b</sup> (0,07)	0,89 <sup>b</sup> (0,8)
<b>Vasos</b>	0,00* (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,02 <sup>a</sup> (0,02)	0,10 <sup>a</sup> (0,78)	0,24 <sup>a</sup> (0,12)	0,12 <sup>a</sup> (0,07)
<b>Estroma</b>	0,00* (0,00)	0,20 <sup>a</sup> (0,07)	0,00 <sup>a</sup> (0,00)	0,11 <sup>a</sup> (0,05)	0,14 <sup>a</sup> (0,07)	0,09 <sup>a</sup> (0,04)	0,09 <sup>a</sup> (0,73)	0,65 <sup>b</sup> (0,11)	0,71 <sup>b</sup> (0,14)
<b>Glândulas Basais</b>	0,81* (0,06)	0,91 <sup>b</sup> (0,06)	0,62 <sup>ab</sup> (0,20)	0,34 <sup>a</sup> (0,12)	0,52 <sup>a</sup> (0,13)	3,66 <sup>e</sup> (0,21)	2,46 <sup>de</sup> (0,53)	1,21 <sup>cd</sup> (0,09)	1,16 <sup>c</sup> (0,07)

**Legenda:** PE1 – Início do proestro; PE2 – Meio do proestro 2; PE3 – Fim do proestro 3; E – Estro; D0-10 – Diestro dos 0 aos 10 dias; D11-30 – Diestro dos 11 aos 30 dias; MD - Meio de diestro; FD – Fim de diestro; A – Anestro. Para cada linha, colunas com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ , *Mann-Whitney U-test*). \* Uma vez que o  $n=2$ , esta coluna não foi contabilizada na estatística.

**Gráfico 3** - Índices de apoptose nos vários compartimentos celulares ao longo do ciclo éstrico.



**Legenda:** PE1 – Início do proestro; PE2 – Meio do proestro 2; PE3 – Fim do proestro 3; E – Estro; D0-10 – Diestro dos 0 aos 10 dias; D11-30 – Diestro dos 11 aos 30 dias; MD - Meio de diestro; FD – Fim de diestro; A – Anestro.

De uma forma geral, verificou-se a marcação de células em apoptose ao longo de todo o ciclo éstrico e, de todos os grupos celulares. No entanto, as glândulas basais foram as que apresentaram índices de apoptose mais elevados.

O maior índice (3,66) observou-se ao nível das células epiteliais das glândulas basais entre os dias 11 e 30 de diestro (Figura 16), mantendo-se ainda elevado no meio do diestro (2,46) quando comparado com as restantes fases ( $p < 0,05$ ).

O final do diestro e o anestro foi caracterizado por um aumento do índice de apoptose nas células do estroma e dos vasos sanguíneos ( $p < 0,05$ ). É de notar que nas células do endotélio dos vasos sanguíneos não houve marcação durante toda a fase proliferativa.

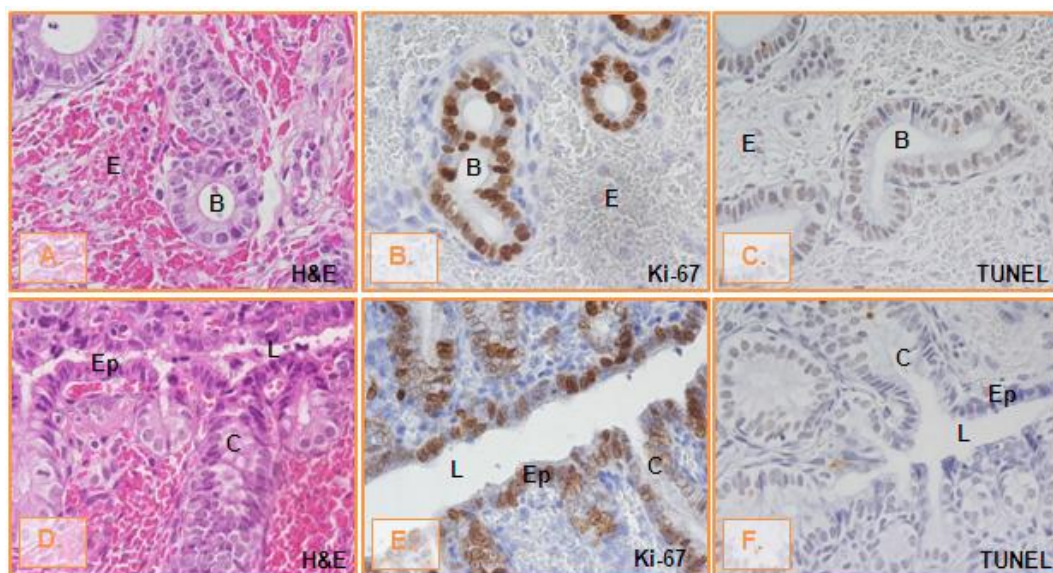
Os restantes grupos celulares, que incluem o epitélio luminal e das criptas, não evidenciaram grandes diferenças ao longo do todo ciclo éstrico ( $p < 0,05$ ), excepto na fase inicial do diestro onde se observaram índices apoptóticos muito baixos, principalmente entre os 11-30 dias no epitélio e entre os 0-10 dias nas criptas ( $p < 0,05$ ) (Figura 15; Figura 16).

Tanto no epitélio luminal como no das criptas os maiores índices de apoptose verificaram-se no final do diestro e durante o anestro, apesar de não serem estatisticamente significativos quando comparados com as fases iniciais do ciclo (Figura 19; Figura 20).

Em alguns úteros de meio de diestro, numa altura em que se observa um elevado índice apoptótico nas glândulas basais, observaram-se agrupamentos destas glândulas (“ilhas glandulares”) que não se encontravam em apoptose e que possuíam características morfológicas de glândulas no início de diestro. Estes agrupamentos para além da menor marcação com o método TUNEL, eram positivos ao Ki-67 e por isso encontravam-se numa fase de proliferação celular (Figura 18).

É ainda de salientar que durante as fases finais do ciclo, nomeadamente no final do diestro e anestro, foi observada uma marcada degenerescência das células do epitélio luminal do endométrio. Estas células mostraram características típicas de degeneração como núcleo picnótico e citoplasma vacuolizado (Figura 19D.).

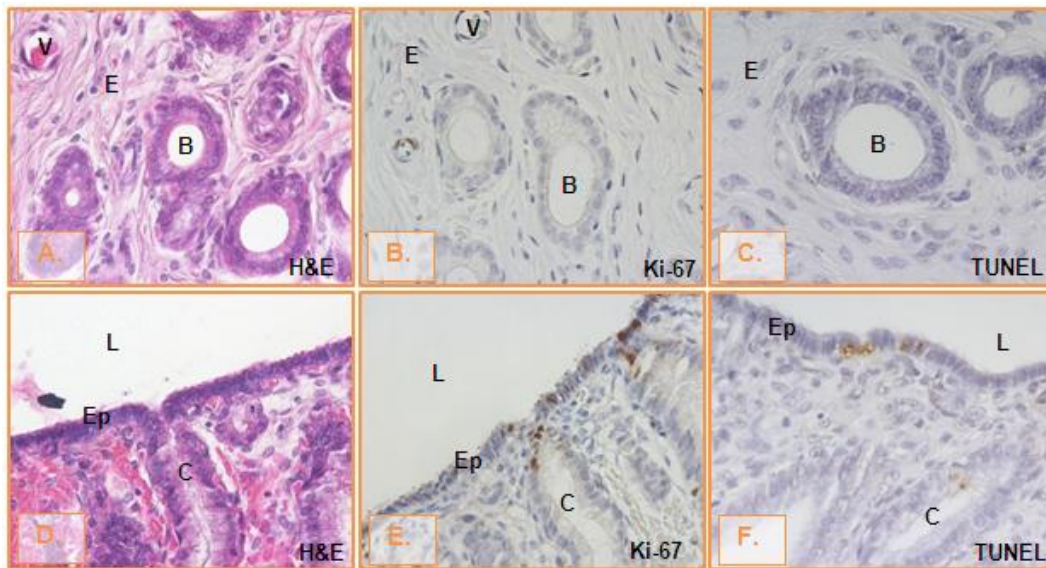
**Figura 13** – Cortes histológicos de útero de cadela em proestro – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL.



**Legenda:** A. – Glândulas basais, coloração H&E (400x); B. – Glândulas basais, marcação Ki-67 (400x); C. – Glândulas basais, marcação TUNEL (400x); D. – Epitélio luminal e criptas, coloração H&E (400x); E. – Epitélio luminal e criptas, marcação Ki-67 (400x); F. – Epitélio luminal e criptas, marcação TUNEL (400x). B – Glândula basal; C – Criptas; E – Estroma; Ep – Epitélio luminal; L – Lúmen uterino.

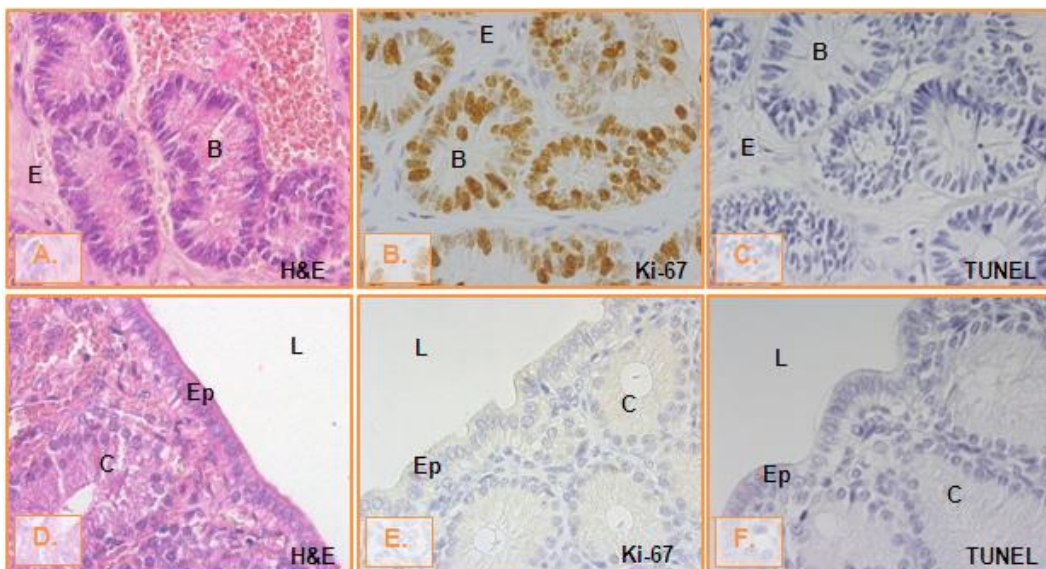


**Figura 14** - Cortes histológicos de útero de cadela em estro – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL.



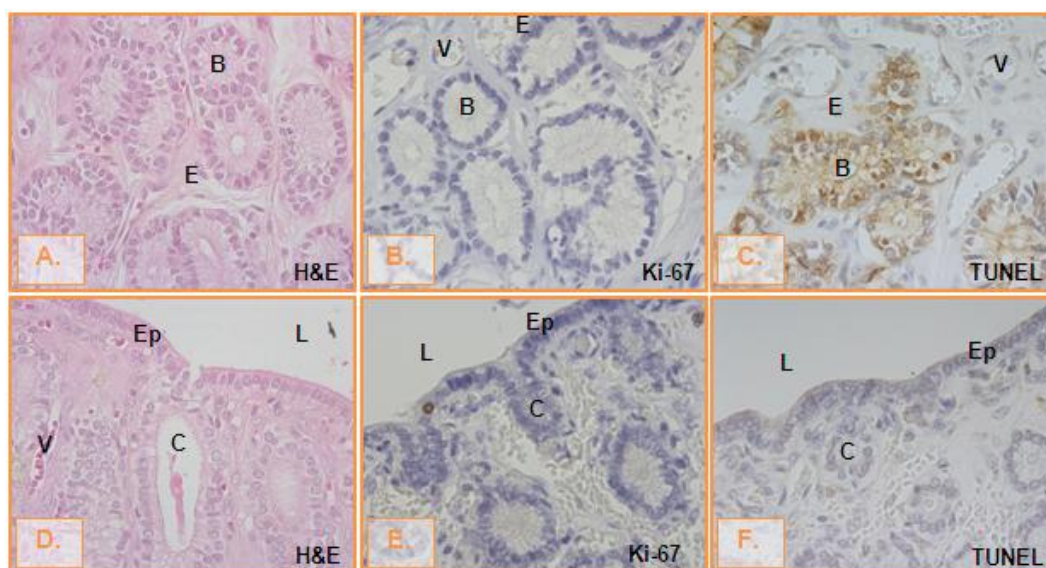
**Legenda:** A. – Glândulas basais, coloração H&E (400x); B. – Glândulas basais, marcação Ki-67 (400x); C. – Glândulas basais, marcação TUNEL (400x); D. – Epitélio luminal e criptas, coloração H&E (400x); E. – Epitélio luminal e criptas, marcação Ki-67 (400x); F. – Epitélio luminal e criptas, marcação TUNEL (400x). B – Glândula basal; C – Criptas; E – Estroma; Ep – Epitélio luminal; L – Lúmen uterino; V – Vaso sanguíneo.

**Figura 15** – Cortes histológicos de útero de cadela no início de diestro (0-10dias) – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL.



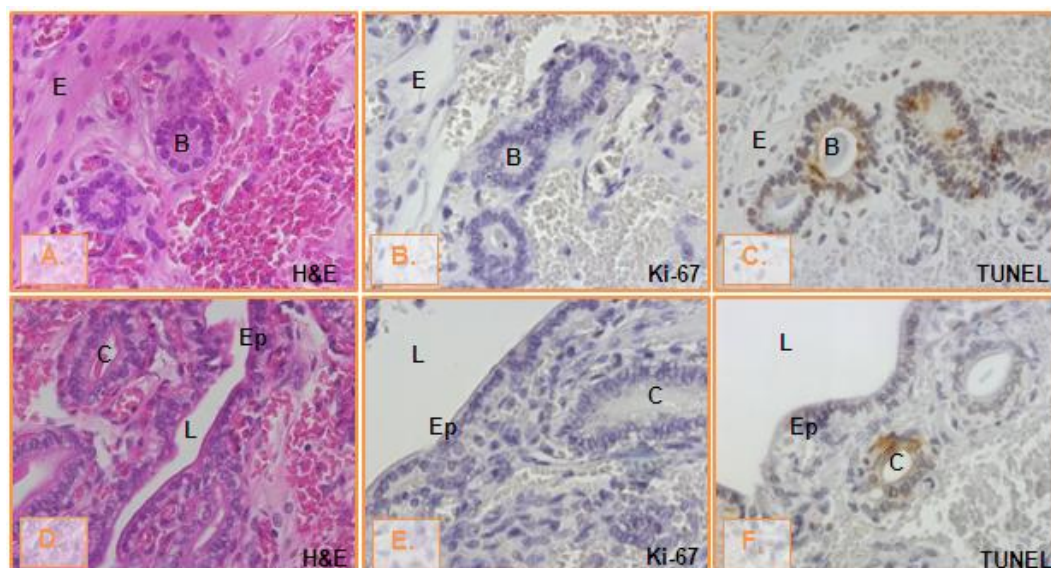
**Legenda:** A. – Glândulas basais, coloração H&E (400x); B. – Glândulas basais, marcação Ki-67 (400x); C. – Glândulas basais, marcação TUNEL (400x); D. – Epitélio luminal e criptas, coloração H&E (400x); E. – Epitélio luminal e criptas, marcação Ki-67 (400x); F. – Epitélio luminal e criptas, marcação TUNEL (400x). B – Glândula basal; C – Criptas; E – Estroma; Ep – Epitélio luminal; L – Lúmen uterino.

**Figura 16** – Cortes histológicos de útero de cadela no início de diestro (11-30 dias) – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL.



**Legenda:** A. – Glândulas basais, coloração H&E (400x); B. – Glândulas basais, marcação Ki-67 (400x); C. – Glândulas basais, marcação TUNEL (400x); D. – Epitélio luminal e criptas, coloração H&E (400x); E. – Epitélio luminal e criptas, marcação Ki-67 (400x); F. – Epitélio luminal e criptas, marcação TUNEL (400x). B – Glândula basal; C – Criptas; E – Estroma; Ep – Epitélio luminal; L – Lúmen uterino; V – Vaso sanguíneo.

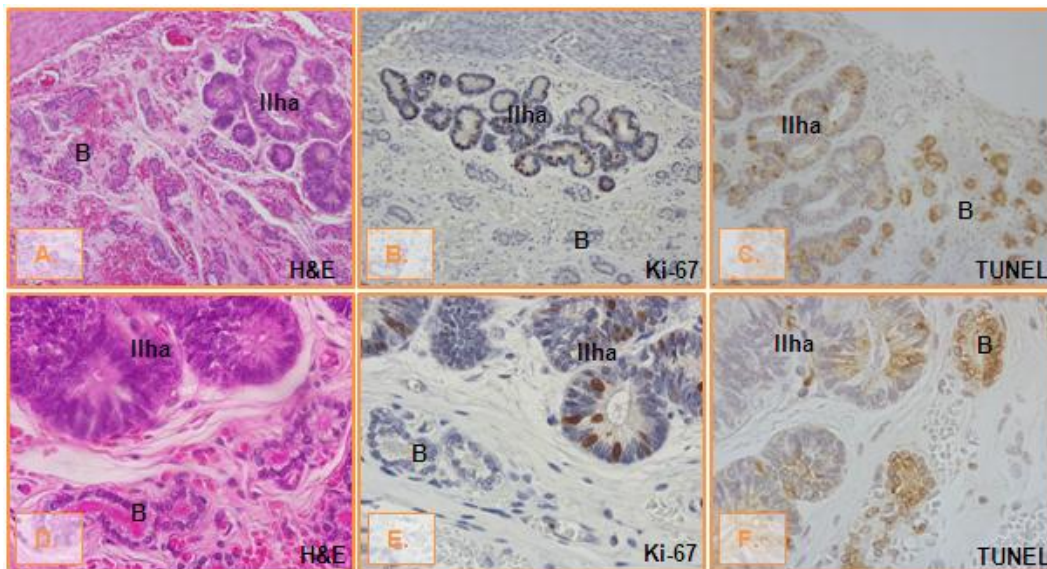
**Figura 17** – Cortes histológicos de útero de cadela no meio de diestro – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL.



**Legenda:** A. – Glândulas basais, coloração H&E (400x); B. – Glândulas basais, marcação Ki-67 (400x); C. – Glândulas basais, marcação TUNEL (400x); D. – Epitélio luminal e criptas, coloração H&E (400x); E. – Epitélio luminal e criptas, marcação Ki-67 (400x); F. – Epitélio luminal e criptas, marcação TUNEL (400x). B – Glândula basal; C – Criptas; E – Estroma; Ep – Epitélio luminal; L – Lúmen uterino.

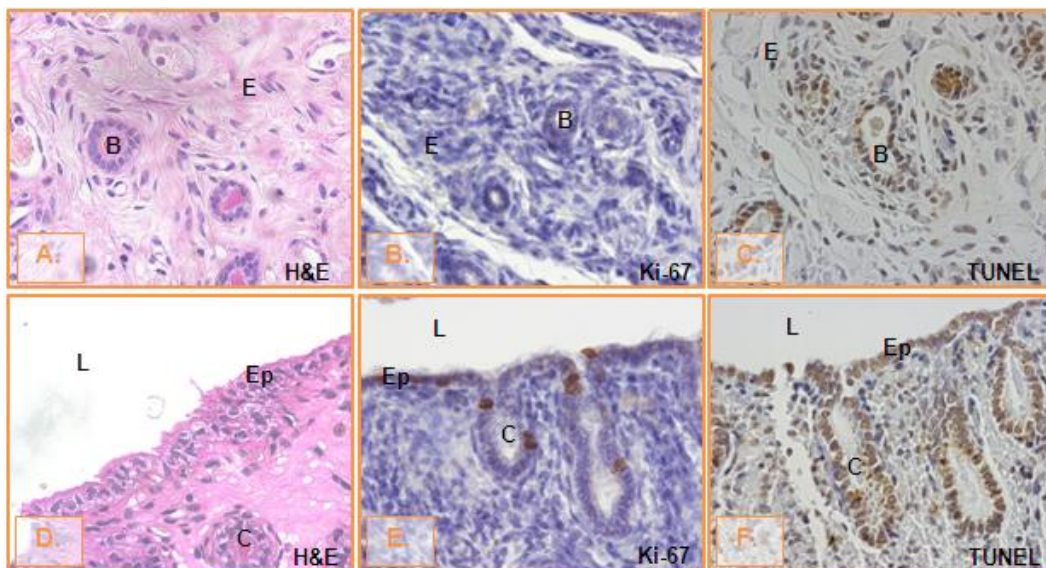


**Figura 18** – Glândulas basais do endométrio - cortes histológicos de útero de cadela no meio de diestro (coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL).



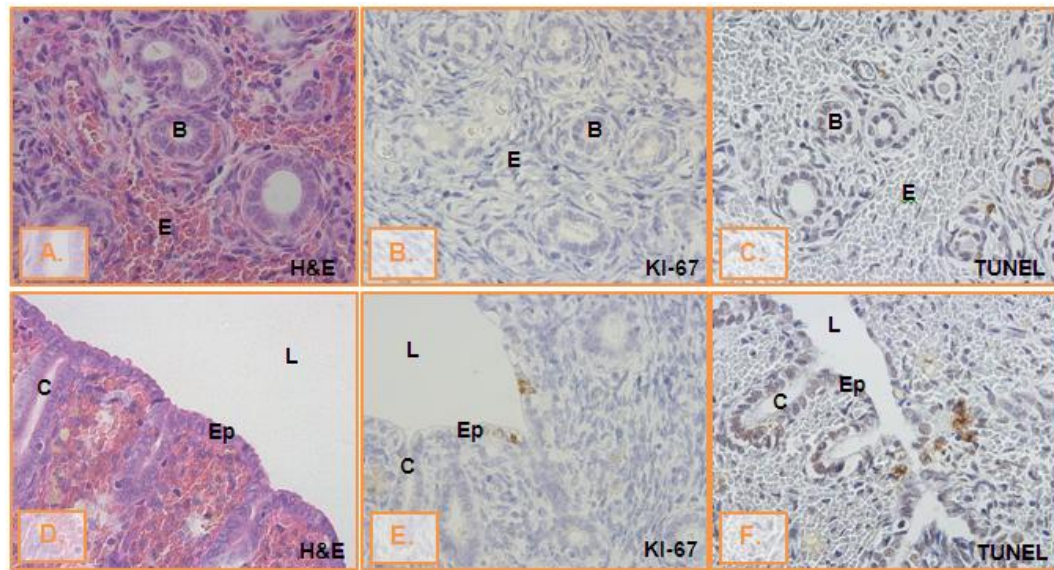
**Legenda:** A. – Glândulas basais, coloração H&E (100x); B. – Glândulas basais, marcação Ki-67 (100x); C. – Glândulas basais, marcação TUNEL (100x); D. – Glândulas basais, coloração H&E (400x); E. – Glândulas basais, marcação Ki-67 (400x); F. – Glândulas basais, marcação TUNEL (400x). B – Glândula basal.

**Figura 19** - Cortes histológicos de útero de cadela no fim de diestro – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL.



**Legenda:** A. – Glândulas basais, coloração H&E (400x); B. – Glândulas basais, marcação Ki-67 (400x); C. – Glândulas basais, marcação TUNEL (400x); D. – Epitélio luminal e criptas, coloração H&E (400x); E. – Epitélio luminal e criptas, marcação Ki-67 (400x); F. – Epitélio luminal e criptas, marcação TUNEL (400x). B – Glândula basal; C – Criptas; E – Estroma; Ep – Epitélio luminal; L – Lúmen uterino.

**Figura 20** – Cortes histológicos de útero de cadela em anestro – coloração H&E, marcação com Ki-67 e TUNEL.



**Legenda:** A. – Glândulas basais, coloração H&E (400x); B. – Glândulas basais, marcação Ki-67 (400x); C. – Glândulas basais, marcação TUNEL (400x); D. – Epitélio luminal e criptas, coloração H&E (400x); E. – Epitélio luminal e criptas, marcação Ki-67 (400x); F. – Epitélio luminal e criptas, marcação TUNEL (400x). B – Glândula basal; C – Criptas; E – Estroma; Ep – Epitélio luminal; L – Lúmen uterino.

#### 4. Discussão dos resultados

O endométrio sofre evidentes alterações histológicas e bioquímicas ao longo do ciclo éstrico. Durante as últimas décadas têm sido realizados estudos em várias espécies com o objectivo de perceber essas alterações, tentando estabelecer a ocorrência de um padrão cíclico e ainda perceber os mecanismos que estão na base do seu controlo.

Nas mulheres, o ciclo éstrico consiste em três fases distintas: proliferativa, secretora e menstrual. A primeira fase é caracterizada pela proliferação celular, e no final da fase secretora e durante a fase menstrual ocorre a apoptose do epitélio glandular (Vaskivuo *et al*, 2000; Harada *et al*, 2004). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos realizados em macacos-rhesus (Wei *et al*, 2005), mas estudos realizados noutros primatas cujo ciclo éstrico não possui fase menstrual revelaram que a apoptose das células do epitélio glandular ocorre mais precocemente no ciclo, ou seja, durante o meio do diestro (Nakar *et al* 2006a; Nakar *et al*. 2006b).

Desde os anos 70 que vários autores mostraram interesse no estudo da dinâmica celular do endométrio da cadela, cujo ciclo éstrico compreende características peculiares nomeadamente a existência de um corrimento sanguinolento durante o proestro e estro (Walter *et al*, 2010) e ainda uma longa duração do ciclo éstrico (Chandra *et al*, 2008).

Em 1975, Barrau *et al*. realizaram um estudo sobre as alterações do endométrio ao longo do ciclo éstrico da cadela onde detectaram dois picos de crescimento e diferenciação celular: o primeiro com início no fim do anestro até ao final do proestro nas células epiteliais das criptas, e o segundo durante o estro nas células epiteliais das glândulas basais do endométrio. Pelo contrário, Spaniel-Borowski *et al*. (1984), apenas observaram um pico de proliferação celular durante o início do proestro em todos os grupos celulares.

No presente estudo, após marcação com o Ki-67, foram observados dois picos de proliferação que envolvem diferentes grupos celulares. No epitélio luminal, nas criptas, no estroma e nos vasos sanguíneos verificaram-se índices de proliferação mais elevados durante o proestro, enquanto que no epitélio das glândulas basais foram observados índices máximos de proliferação tanto no proestro como no início do diestro. A proliferação das glândulas basais no início de diestro coincide com a altura de uma possível implantação do embrião (ocorre aproximadamente entre os 17-21 dias após a fertilização - Feldman & Nelson, 2004) e corresponde ao aumento do número e da tortuosidade das glândulas basais verificado em cortes histológicos de tecido uterino de cadelas nesta fase.

Os resultados descritos por Van Cruchten *et al*. (2004) estão em parte de acordo com o observado no nosso estudo: descrevem igualmente a ocorrência de dois picos de

proliferação que envolvem os mesmos grupos celulares, contudo identificam-nos no proestro e no estro.

A existência de dois picos distintos de proliferação celular pode sugerir que a regulação da proliferação ao nível do epitélio luminal, do estroma, dos vasos sanguíneos e das criptas é diferente da regulação da proliferação ao nível das glândulas basais.

Van Cruchten *et al.* (2004) propõem que a ocorrência de dois picos de proliferação é devida a uma acção hormonal distinta: nas células do epitélio luminal, do estroma, dos vasos e das criptas, a proliferação ocorre sob acção estrogénica; nas glândulas basais a proliferação verifica-se quando a concentração de progesterona está a aumentar.

Resultados semelhantes foram obtidos no endométrio de éguas onde foi observada uma marcada diferença entre o padrão de proliferação das células que pertencem ao estrato luminal (epitélio luminal, criptas e estroma luminal) e as que pertencem ao estrato basal (glândulas basais e estroma basal): as primeiras com uma marcada proliferação durante o estro, onde há domínio do estrogénio; as segundas com maior proliferação no início de diestro, quando as concentrações de progesterona estão a aumentar (Gerstenberg *et al.*, 1999). Contudo, Gerstenberg *et al.* (1999) sugerem que a proliferação nas glândulas basais no início de diestro se deve a um efeito retardado do estrogénio nestas células e não a um efeito directo da progesterona.

Estudos realizados em ratos ovariectomizados, aos quais são administrados estrogénios, revelaram que a proliferação do epitélio luminal ocorre 24h após a administração; contudo, 3 dias após o fim do tratamento hormonal, quando cessa a proliferação do epitélio luminal, ocorre uma onda de proliferação no epitélio glandular; essa onda de proliferação ocorre na ausência de progesterona, e a administração de progesterona inibe a proliferação nos dois grupos celulares (Finn & Martin, 1973; Weitlauf, 1994).

O aumento do índice de proliferação verificado durante o proestro em todos os compartimentos celulares ocorre numa altura em que as concentrações plasmáticas de estrogénio são máximas. Paralelamente, a expressão dos receptores de estrogénio no endométrio também se encontra elevada, devido ao *feedback* positivo exercido pelo estrogénio nos seus próprios receptores. Deste modo, durante o proestro, o tecido uterino apresenta uma elevada sensibilidade ao efeito proliferativo do estradiol (Vermeirsch *et al.*, 1999).

O aparecimento de um segundo pico de proliferação ao nível do epitélio das glândulas basais poderá ser mais difícil de explicar numa altura em que a concentração plasmática de progesterona já se encontra elevada. No entanto, Onclin *et al.* (2002) demonstraram que a concentração plasmática de estrogénio começa novamente a aumentar no início do diestro

(cerca de 10 dias após o pico de LH) permanecendo elevada durante toda a fase lútea (21-42 pg/mL)

Por outro lado, contrariamente ao sugerido por Vermeirsch *et al.*, (1999), foi observado que a concentração dos receptores de estradiol no endométrio é relativamente elevada até ao dia 10 de diestro (Fernandes *et al.*, 1989) e que a expressão dos receptores de estrogénio ao nível do epitélio das glândulas basais é mais elevada que nos restantes grupos celulares (De Cook *et al.*, 1997). Deste modo, o aumento de proliferação observado nos primeiros 10 dias de diestro poderá reflectir novamente a acção do estrogénio ao nível do endométrio e não o efeito directo da progesterona.

Relativamente aos resultados que obtivemos pelo método TUNEL, estes mostraram que o maior índice de apoptose ocorreu ao nível do epitélio das glândulas basais durante o período intermédio do diestro, quando comparado com os restantes grupos celulares e as restantes fases do ciclo éstrico. Estes resultados estão de acordo com os dados anteriormente relatados por Chu *et al.* (2006) que descrevem uma maior apoptose nessas mesmas glândulas entre os dias 12 e 42 de diestro, e são consistentes com a observação da regressão do epitélio glandular que ocorre na mesma altura (Rehm, 2007). Contudo, os resultados obtidos por Van Cruchten *et al.* (2003) relatam que a apoptose nesse grupo celular ocorre principalmente na fase final do diestro e ainda durante o anestro. A diferença nos resultados poderá estar associada a diferentes critérios na caracterização das fases estudadas.

O aumento da apoptose nas glândulas basais verificado durante o diestro e o facto de a proliferação dessas células ocorrer em fases anteriores do ciclo, sugere que a apoptose é responsável pela regressão do epitélio glandular no endométrio da cadela. Numa fase inicial há uma preparação do endométrio principalmente ao nível glandular para a possível implantação do embrião, e caso esta não ocorra, as glândulas sofrem involução. Assim se poderá explicar o facto de ocorrer proliferação nos primeiros 10 dias de diestro nas glândulas basais, seguida de um período com marcada apoptose nas mesmas glândulas, num diestro não gestante.

Interessante foi a observação de “ilhas glandulares” que parecem ser resistentes à apoptose e que ao mesmo tempo apresentam sinais de proliferação, numa altura em que a maioria das glândulas basais já sofreu marcada involução estrutural. Este facto leva-nos a sugerir que estas ilhas possam estar na génese do processo de hiperplasia quística do endométrio. A avaliação de factores pró- e anti-apoptóticos, bem como da expressão dos RE e dos RP poderá esclarecer de que modo é que estas glândulas são resistentes à apoptose.

O baixo índice apoptótico nas células do epitélio luminal do endométrio na fase inicial do diestro é concordante com os resultados descritos por Van Cruchten *et al.* (2003). No entanto, contrariamente ao observado por estes autores, um aumento da apoptose nestas células no final de diestro e anestro não foi verificado no nosso estudo. Sinais de degenerescência do epitélio luminal foram observados durante a fase final do diestro e início de anestro, resultados também obtidos por outros autores (Galabova *et al.* 2003; Chu *et al.* 2006; Groppetti *et al.*, 2010). Um estudo realizado por Chu *et al.* (2006) sobre degenerescência e apoptose nas células endometriais da cadela concluiu que a degenerescência do epitélio luminal ocorre durante o final do diestro, principalmente entre os dias 42 e 49 após o início dessa fase. Tais resultados, em conjunto com outros anteriormente obtidos pelos mesmos autores (Chu *et al.* 2001a; Chu *et al.* 2001b; Chu *et al.*, 2002), indicam que o aparecimento dos sinais de degenerescência do epitélio luminal está associado à diminuição das concentrações de progesterona. Estes autores sugerem ainda que a redução do suprimento sanguíneo pode ter um papel importante no aparecimento desses mesmos sinais, uma vez que observaram um aumento da apoptose das células endoteliais dos vasos sanguíneos numa fase prévia ao aparecimento dos sinais degenerativos do epitélio.

O aumento da apoptose nas células do estroma observado no final do diestro e durante a fase inicial de anestro é consistente com os resultados obtidos por Van Cruchten *et al.* (2003). Nestas fases, o aumento do número de macrófagos, principalmente ao nível do estroma subluminal, poderá estar associado com a fagocitose das células do estroma que sofreram apoptose (Chu *et al.* 2006).



## 5. Conclusão

Durante o ciclo éstrico, o endométrio da cadela sofre alterações morfológicas e bioquímicas que estão associadas com a proliferação, a apoptose e a diferenciação celular. A homeostase dos tecidos reprodutivos resulta de um delicado balanço entre a proliferação celular e a morte celular.

O presente estudo mostrou a existência de padrões de proliferação e apoptose celular do endométrio ao longo do ciclo éstrico da cadela.

O nosso estudo revelou a presença de dois picos de proliferação, um no proestro em todos os grupos celulares e outro nos primeiros 10 dias de diestro apenas nas células epiteliais das glândulas basais. Em ambos os casos, a proliferação celular parece resultar do efeito directo do estrogénio ao nível do endométrio.

A regressão do epitélio glandular basal observada no diestro está associada a mecanismos apoptóticos. O índice apoptótico mais elevado foi observado ao nível do epitélio das glândulas basais durante o período intermédio do diestro, após o período inicial de proliferação. Pelo contrário, a degenerescência do epitélio luminal observada no fim do diestro e início de anestro não parece estar associada a esses mesmos mecanismos.

Alterações nos padrões normais de proliferação e de apoptose celular no endométrio da cadela poderão estar envolvidos na patogenia da hiperplasia quística do endométrio, situação frequente em cadelas mais velhas.

O estudo das vias envolvidas na regulação da apoptose durante o ciclo éstrico, através da avaliação da expressão dos factores pró-apoptóticos (Fas, FasL e Bax) e anti-apoptóticos (Bcl-2) a nível do endométrio poderá ajudar a perceber o balanço entre a proliferação e a apoptose neste tecido.

## CAPÍTULO II

### ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS DO ENDOMÉTRIO CANINO NUM SISTEMA TRIDIMENSIONAL

#### 1. Introdução e Objectivos

A hiperplasia quística do endométrio é uma causa frequente de infertilidade em cadelas mais velhas. Apesar do mecanismo que leva a esta alteração ainda não ser claro, pensa-se que a estimulação estrogénica seguida por um longo período de dominância progestagénica possa estar envolvida (Stadler *et al.*, 2009).

As hormonas esteróides são factores importantes que influenciam a diferenciação glandular, a proliferação celular e a actividade secretora do endométrio (Stadler *et al.*, 2009). Contudo, o estudo dos efeitos directos de alguns factores como o estrogénio e a progesterona no tecido endometrial e a respectiva resposta celular *in vivo* é ainda controverso.

A matriz extracelular é muito importante para a homeostase dos tecidos e, para as células epiteliais, o contacto com uma membrana basal intacta é essencial (Bissel *et al.*, 2002). Actualmente existem substâncias que mimetizam a matriz extracelular e permitem o crescimento e diferenciação de células epiteliais *in vitro*.

Matrigel<sup>TM</sup> é o nome comercial de uma mistura gelatinosa de proteínas que são extraídas do sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) desenvolvido em ratos, cuja constituição é muito semelhante com a da membrana basal (Kleinmann & Martin, 2005; Novin & Nouri, 2007; Stadler *et al.*, 2009). Neste trabalho, o Matrigel<sup>TM</sup> foi utilizado como matriz para suportar o crescimento e diferenciação *in vitro* das células epiteliais e das células do estroma num sistema co-cultura.

Deste modo, o objectivo deste trabalho foi estabelecer *in vitro* um modelo tridimensional de endométrio canino que possibilite o estudo de factores de estimulação e de inibição de crescimento e diferenciação celular.

#### 2. Material e métodos

##### 2.1. Animais

Para este estudo foram utilizados seis úteros de cadelas saudáveis submetidas a ovariectomia (OVH) de rotina. Para caracterizar melhor cada animal, foram recolhidos

dados relativos à anamnese, idade, raça, peso, existência de alguma gravidez prévia, data do último cio e ainda realizada uma breve análise macroscópica do aparelho genital da cadela. As cadelas apresentaram idades compreendidas entre os 2 e os 4 anos de idade (média de 3 anos) e eram todas de raça indeterminada.

As OVHs foram realizadas no Canil Municipal de Sintra (CMS).

### **2.1.1. Colheita das amostras**

Em cada animal, antes da realização da cirurgia, foi realizada uma zaragatoa vaginal para citologia e foi colhido aproximadamente 5 mL de sangue para tubo seco.

Imediatamente após a OVH, com auxílio de material cirúrgico estéril foram colhidas amostras de cada corno uterino (porção cranial e caudal) e ambos os ovários, e seguidamente colocadas em formol tamponado (Formaldeído 4% pH6.9, Merck KGaA, 1.00496.9010, Darmstadt, Alemanha) durante 24h. O volume de formol utilizado foi aproximadamente 50 vezes o volume do fragmento a fixar (Aughey & Frye, 2001; Junqueira & Carneiro, 2005).

Posteriormente, os fragmentos obtidos já fixados foram cortados e incluídos em parafina, utilizando um processador de tecidos LEICA TP 1020. Após a inclusão, foram realizados cortes com 4µm de espessura por intermédio dum micrótomo. Por fim, efectuou-se a coloração dos mesmos com Hematoxilina & Eosina (Hematoxylin Solution Gill No2, Accustain, GHS280, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA; Eosin Y Solution Alcoholic with Phloxine, Accustain, HT110380, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) para posterior análise histológica. Este processamento foi feito no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL).

As citologias vaginais, obtidas através de um esfregaço por aposição de uma zaragatoa vaginal, foram secas ao ar, coradas com giemsa (Accustain® Giemsa stain modified, GS1L-1L, Sigma Aldrich, St Louis, EUA) e posteriormente montadas com entellan (Entellan®, Merck KGaA, 1.07961.0500, Darmstadt, Alemanha).

As amostras de sangue foram centrifugadas (10 min. x 3000g) e o soro armazenado a -20°C em *eppendorfs* até ao seu posterior processamento.

### **2.1.2. Caracterização das amostras**

A fase do ciclo éstrico de cada uma das cadelas foi determinada com base na análise microscópica da citologia vaginal, no doseamento de progesterona sérica e na avaliação macroscópica e histológica do útero e ovários.

A análise da citologia vaginal foi realizada com base nas alterações quantitativas e qualitativas da chave celular (células basais/parabasais, células intermédias, células

superficiais queratinizadas com núcleo picnótico e células superficiais queratinizadas sem núcleo, vulgarmente designadas por escamas).

O doseamento de progesterona foi efectuado, sem extracção de amostra, por quimioluminescência (Immulite 1000, Siemens Healthcare Diagnostics, Lda., Amadora, Portugal), utilizando um kit disponível comercialmente (Immulite 1000 Progesterone Kit, Siemens). O coeficiente de variação inter-ensaio foi para o controlo CON4 (1,66 ng/mL), CON5 (3,8 ng/mL) e CON6 (14,2 ng/mL) variou entre 2-4%. Este procedimento decorreu no Laboratório de Endocrinologia da FMV-UTL.

A avaliação macroscópica do útero e ovários teve como objectivo descrever a morfologia do útero bem como identificar as estruturas existentes nos ovários nomeadamente folículos, corpos hemorrágicos, corpos lúteos, corpos *albicans*. Através da análise histológica, foi possível uma caracterização mais minuciosa dos compartimentos celulares, nomeadamente do epitélio luminal e glandular ao nível do endométrio. Deste modo, com base nas alterações histológicas que o endométrio sofre ao longo do ciclo éstrico descritas por Rehn et al. (2007) e por Chandra *et al.* (2008), foi possível identificar cada fase do ciclo.

Neste estudo foram apenas utilizadas amostras de início diestro I (0-10dias; n=3) e de estro (n=3).

## **2.2. Isolamento e cultura de células**

O protocolo de isolamento utilizado foi baseado no protocolo descrito por Bläuer *et al.* (2005) e por Stadler *et al.* (2009) com algumas modificações.

Imediatamente após a OVH, a porção cranial e caudal de cada corno uterino e ambos os ovários foram fixadas em formol tamponado a 4% até serem processadas histologicamente.

O restante endométrio foi cortado, com auxílio de material cirúrgico estéril, em pequenos pedaços (2-3mm) que foram passados duas vezes no meio de lavagem (Tabela 5). Posteriormente foram incubados no meio de digestão com collagenase tipo A (Tabela 5) durante 2h a 37°C (Estufa Termaks, TS4057, Bergen, Noruega) com agitação. Após a incubação, a acção enzimática da collagenase A foi bloqueada como a adição de meio de centrifugação.

Seguidamente, procedeu-se a um primeiro passo de filtração (Figura 21A) com o objectivo de remover o tecido não digerido, obtendo-se um filtrado constituído por glândulas uterinas (organóides), células epiteliais e células do estroma. De seguida, realizou-se uma segunda filtração através de um filtro de 40µm (Falcon, BD Biosciences, 352340, Erembodegem, Bélgica) (Figura 21B) com vista à separação dos organóides e das células do estroma, sendo ambas as fracções recolhidas, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura com soro fetal bovino (SFB) (meio de cultura 1 -Tabela 5).

A co-cultura foi preparada a partir de organóides e células do estroma do mesmo animal, imediatamente após o seu isolamento.

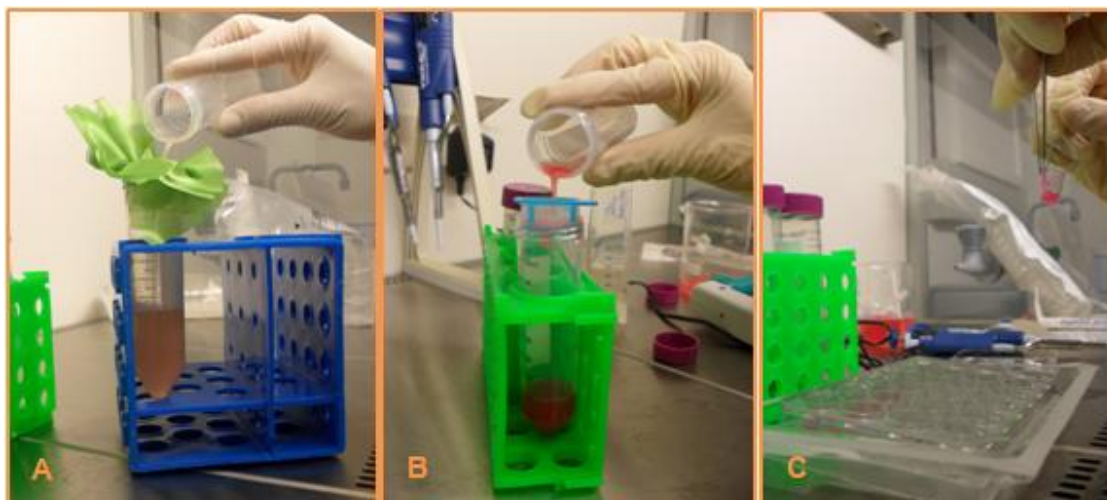
Os organóides (6000 organóides/cm<sup>2</sup>) juntamente com células do estroma (2x10<sup>5</sup> células/mL) foram diluídos em 200 µl de Matrigel™ (BD Biosciences, 354262, Bedford, Reino Unido) e colocados em *inserts* de cultura de células (1,0 µm pore size PET-polyethylene terephthalate, translucent membrane, 353104, Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, França). Foram preparados 5 *inserts* por cada amostra que, após gelificação (30min a 37°C), foram transferidos para uma placa de cultura de 24 poços (Multiwell™ 24 well, 353047, Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, França) (Figura 21C).

Em cada um dos poços foi colocado meio de cultura 1 (500µl no poço e 200 µl no *insert*) (Tabela 5), e as placas foram incubadas a 37°C numa atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub> (Estufa Hera cell150, LABO sistema, Queluz, Portugal).

**Tabela 5 – Constituição dos meios utilizados na cultura de células.**

MEIO	CONSTITUIÇÃO
<b>Lavagem</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HBSS (<i>Hank's buffered salt solution</i>, GIBCO®, 14175-053, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA)</li> <li>• 0,1% BSA (<i>Albumin Bovine</i> 96-99%, Sigma, A3311-50G, St. Louis, Missouri, EUA)</li> <li>• 2% Soro Fetal Bovino (Foetal Bovine Serum, GIBCO®, 10270-106, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA)</li> <li>• 1% penicilina/estreptomicina (Penicilin-streptomycin-glutamine 50mg/mL, GIBCO®, 10378-016, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA)</li> <li>• 1% Anfotericina B (Anfotericine B solution 250µg/mL, Sigma, A-2942, St. Louis, Missouri, EUA)</li> </ul>
<b>Digestão</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM/F-12 (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i> [1:1], GIBCO®, 11039-021, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA)</li> <li>• 0,1% colagenase tipo A (Roche. 10.103.578.001, Mannheim, Alemanha)</li> <li>• 1% penicilina-estreptomicina (GIBCO®)</li> <li>• 1% Anfotericina B (GIBCO®)</li> </ul>
<b>Centrifugação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM/F-12 (GIBCO®)</li> <li>• 2% Soro Fetal Bovino (GIBCO®)</li> <li>• 0,1% BSA (Sigma)</li> <li>• 1% penicilina-estreptomicina (GIBCO®)</li> <li>• 1% Anfotericina B (Sigma)</li> </ul>
<b>Cultura 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM/F-12 (GIBCO®)</li> <li>• 10% Soro Fetal Bovino (GIBCO®)</li> <li>• 0,1% BSA (Sigma)</li> <li>• 1% penicilina-estreptomicina (GIBCO®)</li> <li>• 1% Anfotericina B (Sigma)</li> </ul>
<b>Cultura 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM/F-12 (GIBCO®)</li> <li>• 10% Soro fetal bovino tratado com carvão activado (Charcoal stripped foetal bovine serum, GIBCO®, 12676-029, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA)</li> <li>• 0,1% BSA (Sigma)</li> <li>• 1% penicilina-estreptomicina (GIBCO®)</li> <li>• 1% Anfotericina B (Sigma)</li> </ul>

**Figura 21** – Algumas etapas do processo de isolamento e cultura de células.



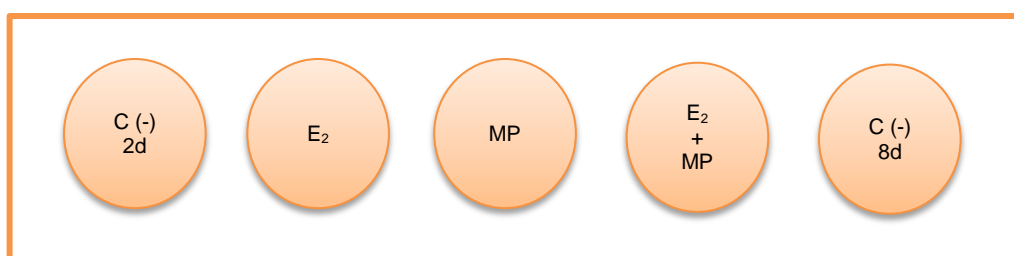
**Legenda:** A – Primeira etapa de filtração; B – Segunda etapa de filtração; C – Colocação do *insert* com matrigel na placa de 24 poços.

### 2.3. Estimulação da cultura de células

Após um período de incubação de 48h, procedeu-se à estimulação com hormonas esteróides a cada dois dias de cultura, num total de três estimulações (dia 2, dia 4, dia 6). As estimulações realizadas para cada amostra estão esquematizadas na Figura 22.

As co-culturas foram estimuladas com  $10^{-8}$  nmol/mL 17 $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -estradiol, Sigma Life Science, E2758-1G, St Louis, EUA), com  $10^{-6}$  nmol/mL 17-acetato medoxiprogesterona (Medroxyprogesterone 17-acetate, Sigma Life Science, M1629-1G, St Louis, EUA) e com ambas as hormonas em simultâneo na mesma concentração. Para a realização das diluições foi utilizado meio de cultura com soro fetal bovino tratado com carvão activado (meio de cultura 2 - Tabela 5). Os controlos negativos foram incubados com o meio de cultura 2 sem suplementação hormonal.

**Figura 22** – Esquema ilustrativo dos poços utilizados para cada amostra com a respectiva estimulação hormonal realizada.



**Legenda:** C(-)2d – Controlo negativo aos 2 dias de estimulação; E<sub>2</sub> – 17 $\beta$ -Estradiol; MP – 17-acetato Medroxiprogesterona; E<sub>2</sub>+MP - 17 $\beta$ -Estradiol + 17-acetato Medroxiprogesterona; C(-)8d – Controlo negativo aos 8 dias de estimulação.

No dia 2 de cultura, foi retirado o *insert* do controlo negativo (C(-)2d) e fixado em formol durante 24h. De seguida, retirou-se o Matrigel<sup>TM</sup> do *insert*, embebeu-se em histogel (Richard-Allan Scientific - Thermo Scientific, HG-4000-012, Walldorf, Alemanha) e colocou-se de novo em formol até posterior processamento histológico.

O mesmo procedimento foi realizado para os restantes *inserts* no dia 8 de cultura.

## **2.4. Imunohistoquímica**

### **2.4.1. Marcação por imunohistoquímica da vimentina e da citoqueratina**

A confirmação da origem epitelial e mesenquimal das células foi feita por imunohistoquímica após marcação com citoqueratina e vimentina, respectivamente.

Após inclusão do matrigel em parafina, foram realizados cortes histológicos consecutivos e montados em lâminas Superfrost® (Menzel Glaeser, D-38116 Braunschweig, Alemanha). Posteriormente os cortes foram desparafinizados, rehidratados e lavados em água corrente durante 5 minutos.

Foi utilizado o kit NovoLink<sup>TM</sup> Polymer Detection System RE7140-K (Leika Microsystems, 35101, Newcastle, Reino Unido) para a realização de todo o protocolo.

A detecção imunohistoquímica foi efectuada pelo método da imunoperoxidase. Como tal, para bloquear a actividade da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas na solução de bloqueio (*Peroxidase Block* - kit NovoLink<sup>TM</sup>) durante 5 minutos e depois lavadas em TBS durante 2x5 minutos. De seguida, para recuperação antigénica, as lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH=6) e submetidas a radiação microondas durante 15 minutos (700W). Após arrefecimento à temperatura ambiente durante 20 minutos, as lâminas foram lavadas em tampão TBS/0,3% Triton X pH=7.2-7.4 durante 5 minutos e incubadas na solução de bloqueio de proteínas (*Protein Block* - kit NovoLink<sup>TM</sup>) durante 10 minutos à temperatura ambiente de forma a bloquear os locais de ligação inespecíficos.

Após a solução de bloqueio, as lâminas foram lavadas em TBS e seguidamente incubadas durante 2 horas com o anticorpo primário anti-citoqueratina (1:100, Mouse monoclonal cytokeratin pan, clones AE1 & AE3, Zytomed systems, MSK019, Berlim, Alemanha) e anti-vimentina (1:100, Monoclonal mousse anti-vimentine, Clone VB, Dako, M0725, Glostrup, Dinamarca). Passadas 2 horas e após lavagem em TBS, as lâminas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente e protegidas da luz com o anticorpo secundário fluorescente anti-mouse (Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG, Invitrogen, A21202, Oregon, EUA).

Posteriormente, as lâminas foram lavadas durante 10 minutos em TBS, sempre protegidas de luz directa, e montadas com vectashield (Vectashield® mounting médium for fluorescence with DAPI, H-1200, Vector Laboratories Inc, Burlingame Califórnia, EUA).

#### **2.4.2. Marcação por imunohistoquímica do Ki-67**

A proliferação celular foi avaliada por imunohistoquímica após marcação com o anticorpo Ki-67.

Após inclusão do matrigel em parafina, foram realizados cortes histológicos consecutivos do tecido artificial e montados em lâminas Superfrost® (Menzel Glaeser, D-38116 Braunschweig, Alemanha). Posteriormente foram desparafinizados, rehidratados e lavados em água corrente durante 5 minutos.

Foi utilizado o kit NovoLink™ Polymer Detection System RE7140-K (Leica Microsystems, 35101, Newcastle, Reino Unido) para a realização de todo o protocolo.

A detecção imunohistoquímica foi efectuada pelo método da imunoperoxidase. Como tal, para bloquear a actividade da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas numa solução de bloqueio (*Peroxidase Block* - kit NovoLink™) durante 5 minutos e seguidamente lavadas em TBS durante 2x5minutos. De seguida, para recuperação antigénica, as lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH=6) e submetidas a radiação microondas durante 15 minutos (700W). Após arrefecimento à temperatura ambiente durante 20 minutos, as lâminas foram lavadas em tampão TBS/0,3% Triton X pH=7.2-7.4 durante 5 minutos e incubadas numa solução bloqueadora de proteínas (*Protein Block* - kit NovoLink™) durante 10 minutos à temperatura ambiente de forma a bloquear os locais de ligação inespecíficos.

Após a solução de bloqueio, as lâminas foram lavadas em TBS e seguidamente incubadas durante 2 horas com o anticorpo primário Ki-67 (1:100, Ki-67 Monoclonal Mouse anti-human Clone Mib1, Dako, M7240, Glostrup, Dinamarca) diluído em tampão TBS.

Após lavagem em TBS, as lâminas foram incubadas durante 30 minutos com a solução *Post Primary Block* (kit NovoLink™), novamente lavadas em TBS e incubadas por mais 30 minutos com a solução *Polymer* (kit NovoLink™). Após nova lavagem em TBS, foi desenvolvida a actividade da peroxidase com a solução de trabalho DAB (kit NovoLink™) durante 5 minutos.

Por último, após lavagem em água corrente durante 5 minutos, as lâminas foram coradas com hematoxilina (Mayer's hemalum solution, Merck KGaA, 1.09249.2500, Darmstadt, Alemanha), novamente passadas por água corrente e posteriormente desidratadas em concentrações crescentes de etanol até xilol e montadas com entellan (Entellan®, Merck KGaA, 1.07961.0500, Darmstadt, Alemanha).



Procedeu-se à contagem das células de todos os organóides existentes em cada corte histológico. Considerou-se como marcação positiva as células cujo núcleo apresentou uma marcação castanha.

#### **2.4.3. Receptores de estrogénio e receptores de progesterona**

Após inclusão do matrigel em parafina, foram realizados cortes histológicos consecutivos do tecido e montados em lâminas Superfrost® (Menzel Glaeser, D-38116 Braunschweig, Alemanha). Posteriormente foram desparafinizados, rehidratados e lavados em água corrente durante 5 minutos.

A detecção imunohistoquímica foi efectuada pelo método da imunoperoxidase, utilizando o mesmo kit e o protocolo anteriormente descrito para o Ki-67, com as seguintes alterações: recuperação antigénica para o RE foi feita com TRIS-EDTA (pH=9; 10mM Tris e 1mM EDTA) e para o RP foi feita com tampão citrato (pH=6); a marcação do RE e do RP foi feita respectivamente, com anticorpo primário anti-RE (Mouse anti-estrogen receptor clone 1D5, MSG001, Berlim, Alemanha) e anticorpo primário anti-RP (Mouse anti-progesterone receptor clone PR-1 Zytomed Systems, MSK002, Berlim, Alemanha), ambos incubados durante 1 hora à temperatura ambiente.

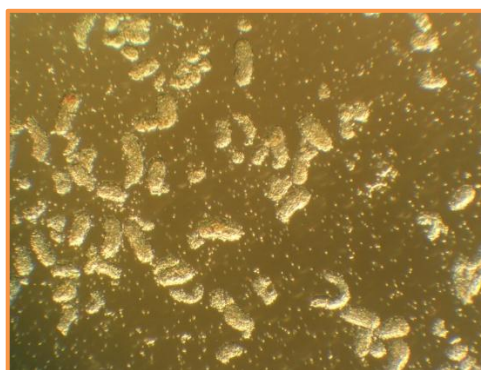
Pelo facto de não se ter conseguido marcação com o anticorpo do receptor de progesterona utilizado, só serão descritos os resultados para os receptores de estrogénio, estando a ser testado outro anticorpo.

### 3. Resultados

#### 3.1. Isolamento e Cultura

A dissociação do tecido uterino com collagenase do tipo A seguida dos passos de filtração permitiu a obtenção de organóides tubulares intactos (Figura 23). O tamanho e o comprimento dos organóides variaram bastante e reflectiram a morfologia das glândulas endometriais do tecido uterino.

**Figura 23** – Organóides obtidos após 2h de digestão na solução de collagenase A (microscópio invertido, 80x).

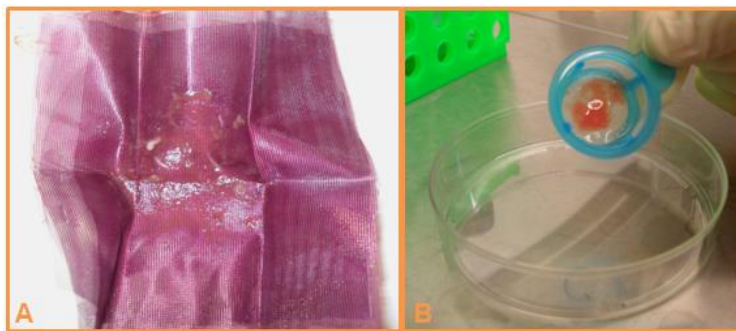


O número e a conservação da estrutura glandular dos organóides depende do tempo de incubação na solução enzimática, e por isso no nosso estudo a incubação durante 2 horas na solução de collagenase foi a escolhida. Com menos tempo de incubação o número de glândulas foi insuficiente, mas a incubação por mais de 2 horas levou a uma maior destruição da estrutura glandular.

A incubação na estufa a 37°C com agitação potencia o efeito da solução enzimática nos pedaços de tecido colhidos.

O isolamento e separação dos dois tipos celulares (células epiteliais e células do estroma) do tecido primário foram realizados recorrendo a passos filtração seguidos de centrifugação. Na primeira filtração foi possível remover o tecido não digerido (Figura 24 A) e na segunda separar os organóides das células do estroma. O filtro usado na segunda filtração permite a passagem das células do estroma, ficando os organóides retidos no filtro (Figura 24 B).

**Figura 24** – Dois passos de filtração realizados para o isolamento das células epiteliais e das células do estroma do endométrio de cadela.



**Legenda:** A – Primeira etapa de filtração - o que ficou retido na gaze é o tecido não digerido pela solução de collagenase A. B – Segunda etapa de filtração – o que ficou retido no filtro foram os organóides e as células epiteliais.

No caso de grande contaminação por eritrócitos, principalmente ao nível do *pellet* de células do estroma, foi necessário fazer um passo de uma lavagem com água destilada estéril (1 minuto) com o fim de lisar os eritrócitos.

No presente estudo foi usada uma matriz, o Matrigel™, cuja constituição é muito semelhante com a da membrana basal. Uma vez que é armazenado a -20°C, para que possa ser manipulado deve ser mantido *overnight* em gelo no frigorífico para que forme uma solução gelatinosa. Aquando da manipulação, uma vez que o Matrigel™ gelifica rapidamente a temperaturas entre os 22°C e os 35°C, todo o material que entre em contacto com a matriz deve estar refrigerado (pontas das pipetas, *inserts*, placas de cultura, etc).

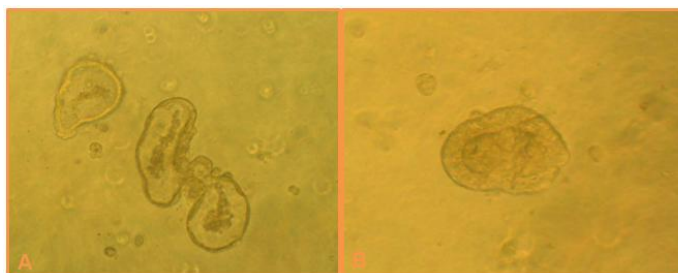
Após a diluição das células do estroma e dos organóides no Matrigel™, e a sua inclusão no *insert*, a placa de cultura foi colocada a 37°C para que ocorresse a gelificação da matriz, antes de se adicionar o meio de cultura.

Para que não ocorra sedimentação das células no *insert*, foi escolhido um Matrigel™ com elevada concentração de proteínas.

A observação das co-culturas às 48h horas permitiu verificar que os organóides provenientes dos úteros da fase de estro apresentavam na maioria sinais de apoptose (Figura 25A). Deste modo só serão apresentados os resultados referentes às co-culturas de início de diestro (Figura 25B).

Antes da estimulação hormonal, as co-culturas foram incubadas 2 dias com meio sem adição de hormonas, consistindo num período de adaptação. Ao longo do restante período de cultura, pudemos observar a existência de algumas glândulas em apoptose.

**Figura 25** – Aspecto dos organóides no matrigel aos 2 dias de cultura.



**Legenda:** A – Organóides em apoptose (400x) ; B – Organóide sem alteração (400x).

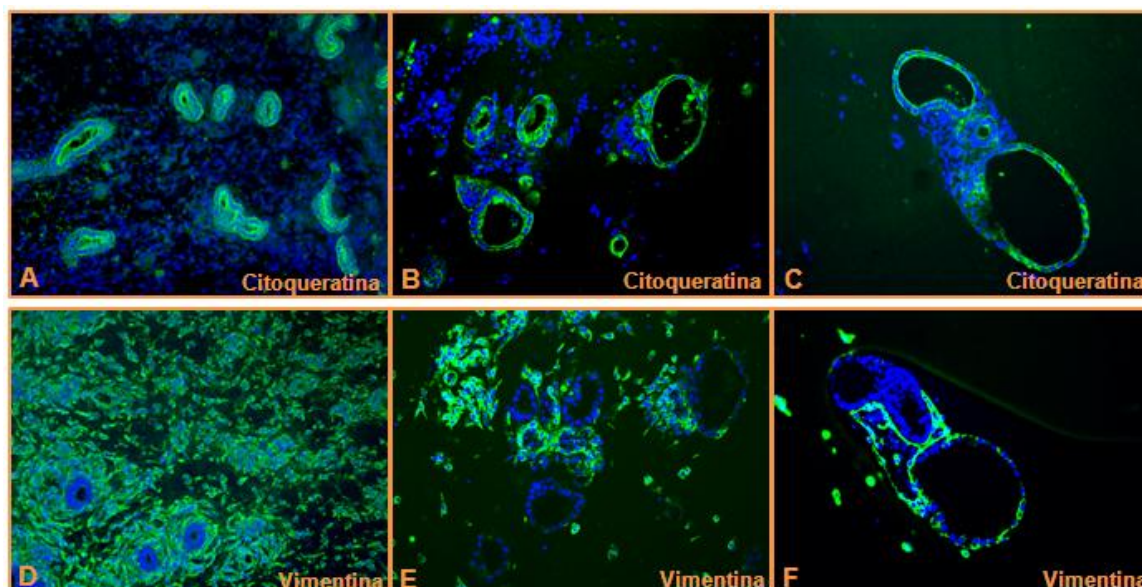
### 3.2. Marcação imunohistoquímica das citoqueratinas e da vimentina

A confirmação da origem epitelial das estruturas glandulares e mesenquimal das células do estroma foi feita por imunohistoquímica através da marcação das citoqueratinas e vimentina, respectivamente.

Todos os organóides expressaram imunoreactividade positiva para as citoqueratinas, o que confirma a sua origem epitelial (Figura 26 B e C). As células do estroma marcaram com a vimentina, o que assegura a sua origem mesenquimal (Figura 26 E e F). Esta marcação não foi influenciada pela estimulação hormonal.

Em paralelo foi realizada marcação imunohistoquímica com os mesmos marcadores em cortes histológicos de tecido uterino (Figura 26 A e D).

**Figura 26** – Marcação imunohistoquímica das citoqueratinas e da vimentina.



**Legenda:** A – Marcação das citoqueratinas das células epiteliais das glândulas do endométrio num corte histológico de tecido uterino (100x); B e C – Marcação das citoqueratinas dos organóides da cultura de células (200x); D – Marcação da vimentina das células do estroma do endométrio num corte histológico de tecido uterino (100x); E e F – Marcação da vimentina das células do estroma da cultura de células (200x).

### **3.3. Proliferação celular e marcação dos receptores de estrogénio**

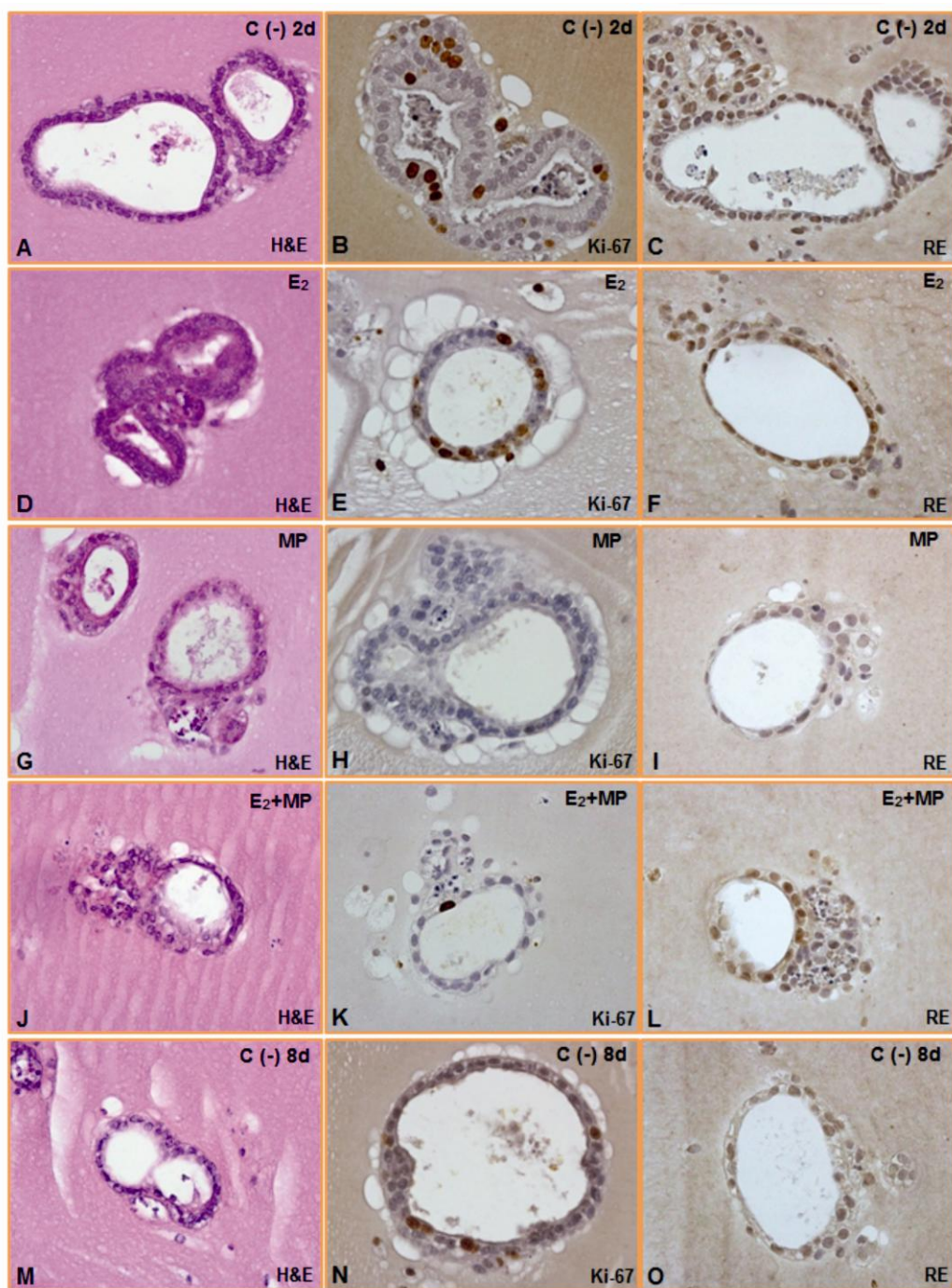
A avaliação histológica dos organóides após 2 dias em cultura revelou estruturas tubulares com morfologia característica mantendo um elevado índice de proliferação, tal como observado no tecido que lhe deu origem (Início de diestro 0-10 dias) (Figura 27B).

Um aumento do número de células epiteliais em proliferação foi observado nas co-culturas tratadas com estradiol (Figura 27E), relativamente ao controlo negativo dos 8 dias de cultura (Figura 27N). Nas co-culturas estimuladas com medroxiprogesterona ou com a associação estradiol e medroxiprogesterona, a proliferação celular foi menor (Figura 27H; Figura 27K), quando comparadas com as da estimulação pelo estradiol e as do controlo negativo dos 8 dias (Figura 27E; Figura 27N). A proliferação das células do estroma não foi afectada pelo tratamento hormonal.

A análise imunohistoquímica dos receptores de estrogénio, permitiu verificar uma maior expressão destes receptores nos organóides das co-culturas estimuladas pelo estradiol (Figura 27F). No entanto, a marcação destes receptores foi observada em todas as condições estudadas (Figura 27). De igual modo, foi possível observar marcação positiva nas células do estroma.



**Figura 27** - Caracterização imunohistoquímica (Ki-67 e RE) dos organóides em co-cultura (400x).



**Legenda:** A – Organóide do controlo negativo do dia 2 (coloração H&E); B - Organóide do controlo negativo do dia 2 (Ki-67); C - Organóide do controlo negativo do dia 2 (RE); D – Organóide estimulado com estradiol (coloração H&E); E - Organóide estimulado com estradiol (Ki-67); F - Organóide estimulado com estradiol (RE); G – Organóide estimulado com medroxiprogesterona (coloração H&E); H - Organóide estimulado com medroxiprogesterona (Ki-67); I - Organóide estimulado com medroxiprogesterona (RE); J – Organóide estimulado com estradiol e medroxiprogesterona (coloração H&E); K - Organóide estimulado com estradiol e medroxiprogesterona (Ki-67); L - Organóide estimulado com estradiol e medroxiprogesterona (RE); M – Organóide do controlo negativo do dia 8 (coloração H&E); N - Organóide do controlo negativo do dia 8 (Ki-67); O - Organóide do controlo negativo do dia 8 (RE) (400x).

#### 4. Discussão dos resultados

As alterações endometriais são um problema comum em várias espécies e podem originar desde problemas de fertilidade até doenças que podem por em risco a vida do animal (Stadler *et al.*, 2009).

O complexo hiperplasia quística do endométrio – piómetra é a afecção endometrial mais frequente na cadela. A etiopatogenia da HQE ainda não está completamente esclarecida, sabendo-se porém que é uma alteração hormono-dependente e que pode predispor ao desenvolvimento de piómetra (Payan Carreira & Pires, 2005; Stadler *et al.*, 2009). Portanto, uma abordagem experimental que permita analisar os factores envolvidos no desenvolvimento desta alteração seria desejável (Stadler *et al.*, 2009).

Em 2004, Galabova-Kovacs *et al.*, estabeleceram um modelo bidimensional de células do endométrio de cadela, com vista a estudar o efeito do estrogénio e da progesterona na expressão de receptores esteróides pelas células do endométrio.

Stadler *et al.* (2009), estabeleceram um modelo tridimensional *in vitro* das glândulas do endométrio de cadelas a partir de úteros em anestro. Nesse estudo, a melhor dissociação do tecido foi obtida após 8 horas de incubação com a colagenase A, provavelmente associado ao facto de um útero em anestro apresentar um número reduzido de glândulas. No nosso estudo, uma vez que o tecido utilizado se encontrava no início de diestro, numa altura em que existe uma grande proliferação das glândulas basais, o tempo de incubação necessário foi de 2 horas.

Uma vez que o presente estudo foi desenvolvido para mimetizar *in vitro* a organização das células epiteliais do endométrio *in vivo*, as células epiteliais foram incluídas numa matriz, a qual permitiu a manutenção da organização das células epiteliais em estruturas glandulares tridimensionais. O contacto com a matriz extracelular bem como com as células do estroma é importante para a manutenção da morfologia e função das células epiteliais tanto *in vivo* como *in vitro* (Bläuer *et al.*, 2005).

A interacção entre as células epiteliais e as células do estroma parece ser crucial na regulação das alterações cíclicas do endométrio. As células epiteliais podem sofrer alterações dependentes das hormonas esteróides, quando os receptores estão apenas presentes nas células do estroma (Vermeirsch *et al.*, 1999; Vermeirsch *et al.*, 2000).

Existem dois territórios de matriz extracelular: um intersticial cuja matriz é rica em colagénio e é onde as células do estroma se localizam; outro pericelular que incluiu a membrana basal onde as células epiteliais estão aderentes (Novin & Nouri, 2007). Esta última é constituída

por colagénio do tipo IV, glicoproteínas como a laminina e a entactina, e proteoglicanos como o sulfato de heparano (Junqueira & Carneiro, 2005; Novin & Nouri, 2007).

Sabe-se que as células epiteliais são altamente influenciadas pela matriz extracelular, principalmente pela membrana basal. A destruição da membrana basal *in vivo* e em cultura pode levar à perda da arquitectura e da diferenciação funcional (Sympson *et al.*, 1994), e induzir a apoptose celular (Boudreau *et al.*, 1995; Aharoni *et al.*, 1997). Esta poderá ser uma explicação para o facto dos organóides provenientes de úteros em estro terem entrado rapidamente em apoptose, situação que não se verificou com os provenientes da fase de diestro.

Uma vez que a existência de uma matriz extracelular é essencial para a manutenção das células, Stadler *et al.* (2009) testaram várias matrizes para a sua substituição *in vitro* nomeadamente: colagénio tipo IV, laminina, fibronectina, gelatina e Matrigel™. Mostraram que todas as matrizes eram capazes de suportar a arquitectura glandular e impedir o crescimento das células em monocamada. Estes autores não verificaram diferenças significativas entre as matrizes, excepto no Matrigel™, no qual as células apresentaram uma melhor morfologia após 4 dias em cultura (Stadler *et al.*, 2009).

Com base nos resultados obtidos por Stadler *et al.* (2009), no presente estudo foi usado o Matrigel™, cuja constituição é muito semelhante à da membrana basal.

Matrigel™ é o nome comercial de uma mistura gelatinosa de proteínas que são extraídas do sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) desenvolvido em ratos (Kleinmann & Martin, 2005; Novin & Nouri, 2007; Stadler *et al.*, 2009). Devido ao seu conteúdo proteico, nomeadamente laminina e colagénio tipo IV, tem sido amplamente usado para dar suporte ao crescimento e diferenciação de células epiteliais *in vitro* (Bläuer *et al.*, 2005; Kleinmann & Martin, 2005; Novin & Nouri, 2007; Stadler *et al.*, 2009).

A citoqueratina é uma proteína do citosqueleto existente nas células epiteliais, enquanto que a vimentina é um filamento proteico intermediário das células de origem mesenquimal como as células do estroma (Galabova-Kovacs *et al.*, 2004). Como tal, a confirmação da origem epitelial das estruturas glandulares e mesenquimal das células do estroma da cultura do presente estudo foi feita por imunohistoquímica através da marcação da citoqueratina e vimentina, respectivamente.

Contudo, vários autores relatam que a vimentina também pode ser expressa em células epiteliais (Galabova-Kovacs *et al.*, 2004; Bläuer *et al.*, 2005). Portanto, é necessária uma interpretação em paralelo de ambos os marcadores: as células que marcam com a citoqueratina são células de origem epitelial, independentemente de poderem ou não expressar vimentina.



No nosso estudo, os organóides retiveram não só a sua integridade estrutural, como também a capacidade de resposta à estimulação hormonal nas condições de cultura utilizadas.

Contrariamente ao observado no nosso estudo, os resultados obtidos por Galabova-Kovacs *et al.* em 2004 revelaram que o estrogénio não teve um efeito positivo evidente na proliferação das células endometriais. No entanto, as células do estroma e as células epiteliais foram cultivadas isoladamente, não tendo sido estudada a possível interacção entre estes dois tipos celulares. Na mulher, a importância desta interacção foi evidenciada, no estudo de Arnold *et al.* (2001), mesmo na ausência de estimulação hormonal.

O resultado obtido a partir de monoculturas de células epiteliais isoladas de endométrio de cadela (Galabova-Kovacs *et al.* 2004), ratinho (Uchima, *et al.*, 1991) e mulher (Classen-Linke *et al.*, 1997), parece implicar que o estradiol pode não ter um efeito mitogénico directo nestas células, sendo mediado pelas células do estroma. No nosso estudo, a presença de receptores de estrogénio nas células do estroma, um pré-requisito para a interacção estroma-epitélio, poderá suportar esta mediação.

A expressão dos RE no endométrio da cadela varia consoante a fase do ciclo éstrico, sendo máxima sob acção dos estrogénios e diminuindo sob acção da progesterona (Vermeirsch *et al.*, 1999; Vermeirsch *et al.*, 2000). O mesmo foi verificado no nosso estudo, no qual a análise imunohistoquímica dos receptores de estrogénio evidenciou uma maior expressão destes receptores nos organóides das co-culturas estimuladas pelo estradiol associada a um maior número de células em proliferação.

## 5. Conclusão

Foi estabelecido um modelo tridimensional para o endométrio canino, no qual as células epiteliais retiveram a resposta à estimulação hormonal. Neste modelo, o estradiol levou a um aumento da proliferação celular, contrariamente ao observado após estimulação isolada com medroxiprogesterona ou em combinação com o estradiol.

Em trabalhos futuros, este modelo pode ser usado para o estudo da influência de outros factores para além das hormonas esteróides, como por exemplo o IGF1, o TGF $\alpha$  e o EGF. Estes factores parecem estar envolvidos na génese da hiperplasia quística do endométrio (Kida *et al.*, 2010). Por outro lado, este tipo de estudo permite reduzir a experimentação animal sendo importante em termos éticos, económicos e até práticas. Para além disso, este modelo de cultura não é só restrito ao tecido do endométrio da cadela e, como tal, pode ser extrapolado para o estudo em outras espécies.



## BIBLIOGRAFIA

- Aharoni, D., Meiri, I., Atzmon, R., Vlodavsky, I. & Amsterdam, A. (1997). "Differential effect of components of extracellular matrix on differentiation and apoptosis". *Curr. Biol.* 7, 43-51.
- Aiudi, G., Albrizio, M., Caira, M. & Cinone, M. (2006). "Apoptosis in canine corpus luteum during spontaneous and prostaglandin-induced luteal regression". *Theriogenology*, 66, 1454-1461.
- Amarante-Mendes, G.P. (2003). "Apoptose: Programa molecular de morte celular". *Einstein*, 1, 15-18.
- Anazetti, M.C. & Melo, P.S. (2007). "Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular." *Metrocamp Pesquisa*, 1, 37-58.
- Arnold, J.T., Kaufman, D.G., Seppälä, M. & Lessey, B.A. (2001). "Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model". *Human Reproduction*, 15(5), 836-845.
- Atasoy, P., Bozdogan, O., Erekul, S., Bozdogan, N. & Bayram, M. (2003). "Fas-mediated pathway and apoptosis in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium". *Gynecologic Oncology*, 91, 309-317.
- Aughey, E. & Frye, F. (2001). *Introduction Comparative veterinary histology: with clinical correlates* (pp. 9-20). Barcelona: Manson Publishing/Veterinary Press
- Barrau, M.D., Abel Jr., J.H., Verhage, H.G. & Tietz Jr., W.J. (1975). "Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch." *American Journal of Anatomy*, 142, 47-65.
- Benetti, A.H., Toniollo, G.H. & Ademir de Oliveira, J. (2004). "Concentrações séricas de progesterona, 17 $\beta$ -estradiol e cortisol durante o final do proestro, estro e diestro gestacional em cadelas". *Ciência Rural Santa Maria*, 34 (2), 471-478.
- Bissell, M.J., Radisky, D.C., Rizki, A., Weaver V.M. & Petersen, O.W. (2002). "The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast". *Differentiation*, 70, 537-546.
- Bläuer, M., Heinonen, P.K., Martikainen, P.M., Martikainen, P.M., Tomás, E. & Ylikomi, T. (2005). "A novel organotypic culture model for normal human endometrium: regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate". *Human Reproduction*, 20 (4), 864-871.
- Boudreau, N., Sympton, C.J., Werb, Z. & Bissell, M.J. (1995) "Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix". *Science*, 267 1199, 891-893.
- Chandra, S.A. & Adler, R.R. (2008) "Frequency of different estrous stages in purpose-bred beagles: a retrospective study". *Toxicologic Pathology* 36: 944-949.
- Chu, P-Y., Lee, S.C. & Wright, P.J. (2001a). "Association of endometrial degeneration in bitches with insufficient plasma progestagen concentrations". *J Reprod Fertil Suppl*, 57, 35-43.

- Chu, P-Y., Lee, S.C. & Wright, P.J. (2001b). "Oestrigen and progestagen treated ovariectomized bitch – a model for the study of uterine function". *J Reprod Fertil Suppl*, 57, 45-54.
- Chu, P-Y., Lee, S.C. & Wright, P.J. (2002). "Apoptosis of endometrial cells in the bitch". *Reprod Fertil Dev*, 14, 297-305.
- Chu, P-Y., Lee, S.C. & Wright, P.J. (2006). "Degeneration and apoptosis of endometrial cells in the bitch". *Theriogenology*, 66, 1545-1549.
- Classen-Linke, I., Kusche, M., Knauthe, R. & Beier, H.M. (1997) "Establishment of human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells". *Cell Tissue Res.*, 287, 171-185.
- Concannon, P.W. (2010). "Reproductive cycles of the domestic bitch". *Animal Reproduction Science*, 124, 200-210.
- Concannon, P.W., Castracane, V.D., Temple, M. & Montanez, A. (2009). "Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores". *Animal Reproduction*, 6, 72–193.
- De Cock, H., Ducatelle, R. & Logghe, J.P. (1997). "Immunohistochemical localization of estrogen receptors in the normal canine female genital tract". *Domestic Animal Endocrinology*, 14(3), 133-147.
- Feldman, E.C. & Nelson, R.W. (2004). "Canine female reproduction". In Feldman, E.C. & Nelson, R.W, *Canine and feline endocrinology and reproduction*. (3<sup>rd</sup>ed.) St. Louis: Saunders-Elsevier.
- Fernandes, P.A., Bowen, R.A., Sawyer, H.R., Nett, T.M. & Gorell, T.A. (1989). "Concentration of receptors for estradiol and progesterone in canine endometrium during estrus and diestrus". *American Journal Veterinary Research* 50(1), 64-67.
- Finn, C.A. & Martin, L. (1973). "Endocrine control of gland proliferation in mouse uterus". *Biology of Reproduction*, 8, 585-588.
- Galabova-Kovacs, G., Egerbacher, M., Aurich, J.E., Leitner, M. & Walter, I. (2003). "Morphological changes of endometrial epithelium in the bitch during metoestrus and anoestrus". *Reprod Dom Anim*, 38, 415-420.
- Galabova-Kovacs, G., Walter, I., Aurich, C. & Aurich, J.E. (2004) "Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro conditions". *Theriogenology*, 61, 963-976.
- Gerstenberg, C., allen, W.R. & Stewart, F. (1999). "Cell proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle". *Journal of Reproduction and Fertility*, 116, 167-175.
- Grivicich, I., Regner, A. & Brondani da Rocha, A. (2007). "Morte celular por apoptose". *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3), 335-343.
- Groppetti, D., Pecile, A., Arrighi, S., Di Giancamillo, A. & Cremonesi, F. (2010). "Endometrial cytology and computerized morphometric analysis of epithelial nuclei: A useful tool for reproductive diagnosis in the bitch". *Theriogenology*, 73, 927-941.
- Harada, T., Kaponis, A., Iwabe, T., Taniguchi, F., Makrydimas, G., Sofikitis, N., Paschopoulos, M., Paraskevaidis, E. & Terakawa, N. (2004). "Apoptosis in human endometrium and endometriosis". *Human Reproduction Update*, 10, 29-38.

- Harada, T., Taniguchi, F., Izawa, M., Ohama, Y., Takenaka, Y., Tagashira, Y., Ikeda, A., Watanabe, A., Iwabe, T. & Terakawa, N. (2007). "Apoptosis and endometriosis". *Frontiers in Bioscience*, 12, 3140-3151.
- Hengarthner, M.O. (2000). "The Biochemistry of apoptosis." *Nature*, 407, 770-776.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2005). *Basic histology: text and atlas*. (11th ed.). New York: McGraw Hill.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
- Kida, K., Maezono, Y., Kawate, N., Inaba, T., Hatoya, S. & Tamada, H. (2010). "Epidermal growth factor, transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor receptor expression and localization in the canine endometrium during the estrous cycles and in bitches with pyometra". *Theriogenology*, 73, 36-47.
- Kleinmann, H. & Martin, G.R. (2005). "Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity." *Seminars in Cancer Biology*, 15, 378-386.
- Lessy, B.A, Wahawisan, R. & Gorrell, T.A. (1981). "Hormonal regulation of cytoplasmatic estrogen and progesterone receptors in the beagle uterus and oviduct". " *Molecular Cell Endocrinology*, 21, 171-180.
- Lockshin, R.A. & Zakeri, Z. (2001). "TIMELINE: Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 545-550.
- Luz, M.R., Cesário, M.D., Binelli, M. & Lopes, M. (2006). "Canine corpus luteum regression: apoptosis and caspase-3 activity". *Theriogenology*, 66, 1448-1453.
- Marti, A., Jaggi, R., Vallan, C., Ritter, P.M., Baltzer, A., Srinivasan, A., Dharmarajan, A.M. & Friis, R.R. (1999). "Physiological apoptosis in hormone-dependent tissues: involvement of caspases". *Cell Death and Differentiation*, 6, 1190-1200.
- Meier, P., Finch A. & Evan, G. (2000). "Apoptosis in development". *Nature*, 407, 796-801.
- Narkar, M., Kholkute, S. & Nandedkar, T. (2006b). "Hormonal regulation of apoptosis in the endometrium of common marmosets (*Callithrix jacchus*)". *Theriogenology*, 66, 1194-1209.
- Narkar, M., Kholkute, S., Chitlange, S. & Nandedkar, T. (2006a). "Expression of steroid hormone receptors, proliferation and apoptotic markers in primate endometrium". *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246, 107-113.
- Novin, M.G. & Nouri, M. (2007). "Effect of matrigel on function and morphology of human endometrial epithelial cell in vitro". *Iranian Biomedical Journal*, 11(2), 87-94.
- Oehler, M.K., Rees, M.C.P. & Bicknell, R. (2000) "Steroids and the Endometrium". *Current Medicinal Chemistry*, 7, 543-560
- Onclin, K., Murphy, B. & Verstegen, J.P. (2002). "Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches". *Theriogenology*, 57, 1957-1972.
- Payan Carreira, R. & Pires, M.A. (2005). "Hiperplasia quística do endométrio em cadelas " *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100, 5-16.

- Polisca, A., Scotti, L., Orlandi, R., Brecchia, G., Maranesi, M., Zerani, M. & Boiti, C. (2010). "Aglepristone (RU534) administration to mid-luteal phase induces early luteal regression". *Theriogenology*, 74, 672-681.
- Rehm, S., Stanislaus, D.J. & Williams, A.M. (2007). "Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels". *Birth Defects Research (Part B)* 80:233-245.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M. & Venkatachalam, M.A. (1999). "Apoptosis: Definition, Mechanisms, and Relevance to Disease." *American Journal of Medicine*, 107, 489-506.
- Saraste, A. & Pulkki, K. (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis". *Cardiovascular Research*, 45, 528-537.
- Song, J., Rutherford, T., Nafiotin, F., Brown, S. & Mor, G. (2002). "Hormonal regulation of apoptosis and the Fas and Fas ligand system in human endometrial cells". *Molecular Human Reproduction*, 8(5), 447-455.
- Spaniel-Borowski, K., Schmalz, V., Thor-Wiedemann, S. & Pilgrim, C. (1984). "Cell Proliferation in the Principal Target Organs of the Dog (Beagle) Ovary during Various Periods of the Estrous Cycle." *Acta Anatomica*, 120, 207-213.
- Stadler, K., Handler, J., Schoenkypl, S. & Walter, I. (2009). "A three-dimensional culture model of canine uterine glands". *In Vitro Cell Dev Biol – Animal*. 45, 35–43.
- Steffl, M., Schweiger, M., Sugiyama, T. & Amselgruber, W.M. (2008). "Review of apoptotic and non-apoptotic events in non-ciliated cells of mammalian oviduct." *Annals of Anatomy*, 190, 46-52.
- Sympson, C.J., Talhouk, R.S., Alexander, C.M., Chin, J.R., Clift, S.M., Bissel, M.J. & Werb, Z. (1994). "Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression". *Journal Cell. Biol.*, 1253, 681-693.
- Uchima F.D., Edery, M., Iguchi, T. & Bern, H.A. (1991) "Growth of mouse endometrial luminal epithelial cells in vitro: functional integrity of the oestrogen receptor to induce proliferation". *Journal of Endocrinology*, 128, 115-120.
- Van Cruchten, S. & Van Den Broeck, W. (2002). "Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis". *Anat. Histol. Embryo.*, 31, 214-223.
- Van Cruchten, S., Van den Broeck, W., D'haeseleer, M. & Simoens, P. (2004). "Proliferation patterns in the canine endometrium during the estrous cycle". *Theriogenology*, 62, 631-641.
- Vaskivuo, T.E., Stenback, F., Karhumaa, P., Risteli, J., Dunkel, L. & Tapanainen, J.S. (2000). "Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium". *Molecular and Cellular Endocrinology*, 165, 75-83.
- Vaux, D.L. & Strasser, A. (1996). "The molecular biology of apoptosis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2239-2244.
- Vermeirsch, H., Simoens, P., Hellemans, A., Coryn, M. & Lauwers, H (2000), "Immunohistochemical detection of progesterone receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels". *Theriogenology*, 53, 773-788.

- Vermeirsch, H., Simoens, P., Lauwers, H. & Coryn, M. (1999), "Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels". *Theriogenology*, 51, 729-743.
- Vermeulen, K., Van Bockstale, D.R. & Berneman, Z.N. (2005). "Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer". *Ann Hematol*, 84, 627-639.
- Vinatier, D., Dufour, Ph. & Subtil, D. (1996). "Apoptosis: A programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology." *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 67, 85-102.
- Walter, I., Galabova, G., Dimov, D. & Helmreich, M. (2010). "Morphological basis of proestrus endometrial bleeding in canines". *Theriogenology*, 75, 411-420.
- Wei, P., Jin, X., Tao, S-X., Han, C-S. & Liu, Y-X (2005). "Fas, FasL, Bcl-2 and Bax in the endometrium of reshus monkey during the menstrual cycle". *Molecular and Cellular Endocrinology*, 70, 478-484.
- Weitlauf, H.M. (1994). "Biology of implantation". In Knobil, E. & Neill, J.D. *The Physiology of Reproduction* (2<sup>nd</sup>ed) Raven Press Ltd, New York.
- Ziegler, U. & Groscurth, P. (2004). "Morphological features of cell death." *News in Physiological Science*, 19, 124-128.